

VERGLEICHENDE CALCINOGENITÄT VERSCHIEDENER VITAMIN D - METABOLITE BEIM KANINCHEN

Brigitte Schäfer

Disbui. München

1988

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Priv. Doz. Dr. Dr. habil. W. Rambeck

VERGLEICHENDE CALCINOGENITÄT VERSCHIEDENER VITAMIN D - METABOLITE BEIM KANINCHEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Brigitte Schäfer
aus Coburg

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse
Referent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil. W. Rambeck
Korreferent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil. W. Klee

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

1.	Verzeichnis der Werke	1
2.	Verzeichnis der Werke	2
3.	Verzeichnis der Werke	3
4.	Verzeichnis der Werke	4
5.	Verzeichnis der Werke	5
6.	Verzeichnis der Werke	6
7.	Verzeichnis der Werke	7
8.	Verzeichnis der Werke	8
9.	Verzeichnis der Werke	9
10.	Verzeichnis der Werke	10
11.	Verzeichnis der Werke	11
12.	Verzeichnis der Werke	12
13.	Verzeichnis der Werke	13
14.	Verzeichnis der Werke	14
15.	Verzeichnis der Werke	15
16.	Verzeichnis der Werke	16
17.	Verzeichnis der Werke	17
18.	Verzeichnis der Werke	18
19.	Verzeichnis der Werke	19
20.	Verzeichnis der Werke	20
21.	Verzeichnis der Werke	21
22.	Verzeichnis der Werke	22
23.	Verzeichnis der Werke	23
24.	Verzeichnis der Werke	24
25.	Verzeichnis der Werke	25
26.	Verzeichnis der Werke	26
27.	Verzeichnis der Werke	27
28.	Verzeichnis der Werke	28
29.	Verzeichnis der Werke	29
30.	Verzeichnis der Werke	30
31.	Verzeichnis der Werke	31
32.	Verzeichnis der Werke	32
33.	Verzeichnis der Werke	33
34.	Verzeichnis der Werke	34
35.	Verzeichnis der Werke	35
36.	Verzeichnis der Werke	36
37.	Verzeichnis der Werke	37
38.	Verzeichnis der Werke	38
39.	Verzeichnis der Werke	39
40.	Verzeichnis der Werke	40
41.	Verzeichnis der Werke	41
42.	Verzeichnis der Werke	42
43.	Verzeichnis der Werke	43
44.	Verzeichnis der Werke	44
45.	Verzeichnis der Werke	45
46.	Verzeichnis der Werke	46
47.	Verzeichnis der Werke	47
48.	Verzeichnis der Werke	48
49.	Verzeichnis der Werke	49
50.	Verzeichnis der Werke	50
51.	Verzeichnis der Werke	51
52.	Verzeichnis der Werke	52
53.	Verzeichnis der Werke	53
54.	Verzeichnis der Werke	54
55.	Verzeichnis der Werke	55
56.	Verzeichnis der Werke	56
57.	Verzeichnis der Werke	57
58.	Verzeichnis der Werke	58
59.	Verzeichnis der Werke	59
60.	Verzeichnis der Werke	60
61.	Verzeichnis der Werke	61
62.	Verzeichnis der Werke	62
63.	Verzeichnis der Werke	63
64.	Verzeichnis der Werke	64
65.	Verzeichnis der Werke	65
66.	Verzeichnis der Werke	66
67.	Verzeichnis der Werke	67
68.	Verzeichnis der Werke	68
69.	Verzeichnis der Werke	69
70.	Verzeichnis der Werke	70
71.	Verzeichnis der Werke	71
72.	Verzeichnis der Werke	72
73.	Verzeichnis der Werke	73
74.	Verzeichnis der Werke	74
75.	Verzeichnis der Werke	75
76.	Verzeichnis der Werke	76
77.	Verzeichnis der Werke	77
78.	Verzeichnis der Werke	78
79.	Verzeichnis der Werke	79
80.	Verzeichnis der Werke	80
81.	Verzeichnis der Werke	81
82.	Verzeichnis der Werke	82
83.	Verzeichnis der Werke	83
84.	Verzeichnis der Werke	84
85.	Verzeichnis der Werke	85
86.	Verzeichnis der Werke	86
87.	Verzeichnis der Werke	87
88.	Verzeichnis der Werke	88
89.	Verzeichnis der Werke	89
90.	Verzeichnis der Werke	90
91.	Verzeichnis der Werke	91
92.	Verzeichnis der Werke	92
93.	Verzeichnis der Werke	93
94.	Verzeichnis der Werke	94
95.	Verzeichnis der Werke	95
96.	Verzeichnis der Werke	96
97.	Verzeichnis der Werke	97
98.	Verzeichnis der Werke	98
99.	Verzeichnis der Werke	99
100.	Verzeichnis der Werke	100

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	5
2.1	Vorkommen von Vitamin D	5
2.2	Vitamin D ₃ -Metabolisierung im Körper	6
2.3	Physiologische Wirkungen von Vitamin D ₃	8
2.4	Metabolisierung und physiologische Wirkungen von Vitamin D ₂	10
2.5	Vitamin D ₂ und Vitamin D ₃ bei verschiedenen Tierarten	11
2.6	Therapeutischer Einsatz von Vitamin D und seinen Metaboliten	13
2.7	Toxizität von Vitamin D und seinen Metaboliten	17
2.8	Verkalkende Wirkung von Vitamin D und Vitamin D-Metaboliten auf das Gefäß - und Organsystem	19
2.8.1	Auftreten von Weichgewebsverkalkungen	19
2.8.2	Pathogenese und Morphologie der Verkalkungen	20
2.8.3	Biochemischer Vorgang der Verkalkung am Elastin	21
2.8.4	Entstehung der Urämie	22
2.9	Die Calciumhomöostase des Kaninchens	22

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1	Tiermaterial	25
3.2	Tierhaltung	26
3.3	Versuchsdurchführung	26
3.4	Probenentnahme und Bestimmungsmethoden	28
3.4.1	Gewichtsentwicklung	28
3.4.2	Serumgewinnung und Bestimmung der Serumparameter	28

3.4.3	Knochenaschebestimmung	30
3.5	Pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Bestimmungsmethoden	30
3.6	Statistik	31
4.	VERSUCHSBESCHREIBUNG UND ERGEBNISSE	32
4.1	Calcinogenität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Versuch 1)	32
4.2	Vergleichende Calcinogenität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (A) und $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ (B). A:B = 1:1 (Versuch 2)	41
4.3	Vergleichende Calcinogenität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (A) und $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ (B). A:B = 1:4 (Versuch 3)	50
4.4	Vergleichende Calcinogenität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (A) und $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ (B). A:B = 1.5:3 (Versuch 4)	59
4.5	Vergleichende Calcinogenität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (A) und $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ (B). A:B = 1.5:4.5 (Versuch 5)	69
5.	DISKUSSION	79
5.1	Vergleich der calcinogenen Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	79
5.2	Vergleich der calcinogenen Wirkung von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$	81
5.3	Vergleich der calcinogenen Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}$	82
5.4	Diskussion der Gewichtsentwicklung, Serumparameter und Knochenasche	83
5.5	Abschließende Bemerkungen	85
6.	ZUSAMMENFASSUNG	87
	SUMMARY	88
7.	LITERATURVERZEICHNIS	90

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Wie Skelettfunde deformierter Knochen beweisen, traten schon in prähistorischer Zeit Vitamin D-Mangelkrankheiten auf (IVANHOE, 1970). Obwohl im 17. Jahrhundert Krankheitsbilder mit Verbiegungen der Röhrenknochen, Auftreibungen der Gelenke und Deformationen des Brustkorbes ausführlich beschrieben wurden, blieb die Ursache bis zu Beginn des 20. Jahrhundert ungeklärt.

Im Zeitalter der industriellen Revolution breitete sich die nun als "Rachitis" oder "englische Krankheit" bezeichnete Erkrankung endemisch in Nordamerika und Nordwesteuropa aus. Die Behandlung der Rachitis durch Frischluft, Sonnenlicht und Lebertran, führte zur Entdeckung von Vitamin D.

Den Beweis für die heilende Wirkung des Sonnenlichts und der künstlichen Höhensonne lieferte HULDSHINSKY im Jahre 1919. Zur gleichen Zeit gelang es MELLANBY bei jungen Hunden mittels einer Getreidediät und unter Abwesenheit von Sonnenlicht ein Krankheitsbild hervorzurufen, welches dem der Rachitis des Menschen stark ähnelte und durch Gabe von Lebertran zu heilen war (MELLANBY, 1919). Erst 3 Jahre später wurde der antirachitische Faktor im Lebertran identifiziert und als Vitamin D bezeichnet (MCCOLLUM et al., 1922).

Durch ultraviolette Bestrahlung von Nahrungsmitteln und tierischer Haut konnte die Bildung von fettlöslichem, antirachitisch wirkendem Vitamin D induziert werden (STEENBOCK und BLACK, 1924). Erst nach der Identifikation von Vitamin D₂ als antirachitischem Faktor in Pflanzen (ASKEW et al., 1931; WINDAUS et al., 1932) und der chemischen Charakterisierung und Isolierung von Vitamin D₃ aus bestrahltem 7-Dehydrocholesterin (WINDAUS et al., 1936) konnte die Rachitis gezielt therapiert werden.

Während eine lange und intensive Bestrahlung der Haut mit ultravioletttem Licht keine Vitamin D₃-Intoxikationen im Körper hervorrief, wurde von einer ersten oral induzierten Vitamin D₃-Hypervitaminose im Jahre 1929 berichtet (KREITMAIR

und MOLL, 1929).

Die bedeutende Funktion von Vitamin D, durch Verbesserung der intestinalen Calcium - und Phosphatabsorption deren Plasmakonzentrationen zu regulieren, wurde von NICOLAYSEN entdeckt (NICOLAYSEN, 1937). Die Beobachtung, daß nach oraler Vitamin D - Gabe die Wirkung auf den Calciumstoffwechsel erst verzögert eintritt (LINDQUIST, 1952), bildete den Übergang zu weiteren Forschungen.

Mit der Entdeckung, daß Vitamin D₃ zum Erlangen seiner biologischen Aktivität erst im Stoffwechsel metabolisiert werden muß (LUND und DeLUCA, 1966), begann ein neues Kapitel in der Vitamin D Forschung. DeLUCA und Mitarbeiter konnten zeigen, daß Vitamin D₃ in der Leber zu 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D₃) hydroxyliert wird (BLUNT et al., 1968). Bald darauf wurde die Niere als Produktionsstätte des biologisch aktivsten Vitamin D-Metaboliten erkannt, welcher schließlich als 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)₂D₃) identifiziert wurde (FRASER und KODICEK, 1970). Mittlerweile sind in vivo mehr als 20 verschiedene Metabolite nachgewiesen. Außer den physiologisch aktivsten Formen 25(OH)D₃, 1,25(OH)₂D₃ und 24,25(OH)₂D₃, wird den meisten Molekülen allgemein nur eine katabole Rolle mit geringer biologischer Wirkung zugesprochen (NORMAN et al., 1982a; DeLUCA und SCHNOES, 1983).

Vitamin D₂ wird in analoger Weise wie Vitamin D₃ metabolisiert (JONES et al., 1976a,b). DeLUCA und Mitarbeitern gelang es erstmalig 1,25-Dihydroxyergocalciferol (1,25(OH)₂D₂) aus Hühnernieren zu isolieren und zu identifizieren (JONES et al., 1975). Die im Körper gebildeten Vitamin D₂ - Stoffwechselprodukte stellen, da Vitamin D₂ nur mit der Nahrung zugeführt wird und damit auch als "körperfremd" angesehen werden kann, im eigentlichen Sinn keine physiologischen Vitamin D-Metabolite dar.

Die Erkenntnis, daß nicht das Vitamin D sondern seine Metabolite für die biologische Wirkung verantwortlich sind,

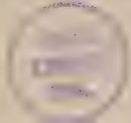
führte zur Entwicklung neuer Methoden die einzelnen Metabolite zu isolieren, zu synthetisieren und Strukturanaloga herzustellen.

Mit der Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (SEMMLER et al., 1972) wurde eine hochaktive Substanz gefunden, die nun auch bei der bislang erfolglosen Behandlung von Vitamin D-Stoffwechselstörungen wie zum Beispiel der renalen Osteodystrophie wirksam war. Bald jedoch entdeckte man die sehr geringe therapeutische Breite von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und die damit verbundenen Intoxikationsgefahren. Unerwünschte Demineralisationen der Knochen und Verkalkungen in den Gefäßen und einzelnen Organen traten teilweise schon bei geringer Überdosierung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf.

Die chemische Herstellung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ gelang erst vor einigen Jahren (PAAREN et al., 1980). Damit ist dieser Metabolit nun auch in größeren Mengen und kostengünstiger verfügbar als es bisher durch Biosynthese möglich war.

Die Synthese von 1α -Hydroxyvitamin D_3 ($1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$; HOLICK et al., 1973) war einfacher und billiger als diejenige von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Da es durch die ubiquitäre 25-Hydroxylase in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ umgewandelt wird (WALTERS et al., 1983), ist es für die Therapie der renalen Osteopathien von großer Bedeutung. Die therapeutischer Breite von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ scheint jedoch im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch nicht günstiger zu sein (VOIGTS et al., 1983). Im Tierexperiment an Mäusen erwies sich $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ toxischer als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (CROCKER et al., 1985).

Die Herstellung von 1α -Hydroxyvitamin D_2 ($1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$; LAM et al., 1974 und 1977) war zunächst unwirtschaftlich, ihr Wirkungsspektrum kaum untersucht. Heute gibt es einfachere Syntheseverfahren (PAAREN et al., 1980). Die überraschende Erkenntnis, daß bei der Ratte bei einer vergleichbaren antirachitischen Aktivität eine merklich geringeren Toxizität von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ gegenüber $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ besteht (SJÖDEN et al., 1985c), ließ dieser Substanz Bedeutung zukommen.



In der Therapie von Hypocalcämien und Osteomalazien sind die Vitamin D₃-Metabolite gut wirksam. Ihre geringe therapeutische Breite gestaltet ihre Anwendung jedoch schwierig. Wie sich die entsprechenden Vitamin D₂-Metabolite verhalten ist noch kaum untersucht. Schon mehrmals wurde von einer geringeren Knochencalciummobilisation nach Applikation von Vitamin D₂ oder seiner Metaboliten berichtet (REEVE et al., 1978; SJÖDEN et al., 1984a; TJELLESEN et al., 1985a). Falls sich die Annahmen bestätigen und die Vitamin D₂-Metabolite bei gleicher biologischer Aktivität eine geringere Toxizität gegenüber den Vitamin D₃-Metaboliten zeigen, wären 1,25(OH)₂D₂ und 1α(OH)D₂ für die Zukunft von großem therapeutischen Interesse.

Ein systematischer Vergleich der biologischen Aktivität und Calcinogenität dieser hochwirksamen Metabolite an verschiedenen Tiermodellen ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde an wachsenden Kaninchen die calcinogene Wirkung von 1,25(OH)₂D₂, 1,25(OH)₂D₃, 1α(OH)D₂ und 1α(OH)D₃ untersucht. Es sollte geklärt werden, wie sich die natürlich im Körper gebildeten und auch synthetisch herstellbaren Vitamin D-Metabolite 1,25(OH)₂D₂ und 1,25(OH)₂D₃ bezüglich ihrer Calcinogenität untereinander, und im Vergleich zu ihren nur am Kohlenstoffatom C-1 hydroxylierten Strukturanalogen verhalten. Die Metabolite wurden stark überdosiert verabreicht um anhand der herbeigeführten Verkalkungen der Weichgewebe die verwendeten Substanzen vergleichen zu können. Diese experimentell erzeugten Verkalkungen wurden pathologisch-anatomisch und pathologisch-histologisch untersucht, und nach einem subjektiven semiquantitativen Einteilungsschema ausgewertet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf eine chemische Aufbereitung der Proben und eine anschließende statistische Auswertung verzichtet.

Im folgenden Text bezeichnet Vitamin D ohne Fußnote sowohl Vitamin D₂ als auch Vitamin D₃. Das gleiche gilt für die Metabolite.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 VORKOMMEN VON VITAMIN D

Vitamin D₂ und Vitamin D₃ sind Secosteroide, die sich lediglich in ihrer Seitenkette unterscheiden. Vitamin D₂ hat am Kohlenstoffatom C-24 zusätzlich eine Methylgruppe und eine Doppelbindung zwischen C-22 und C-23.

Vitamin D₂ (Ergocalciferol) ist pflanzlichen Ursprungs. Es entsteht durch eine durch die UV-Strahlung des Sonnenlichts katalysierte Spaltung aus dem Provitamin Ergosterol, welches in höheren Pflanzen, Pilzen und Hefen enthalten ist.

Vitamin D₃ (Cholecalciferol) wird im Stratum germinativum der Haut nach Bestrahlung mit ultravioletem Licht aus 7-Dehydrocholesterol synthetisiert. Bei dieser photolytischen Spaltung entsteht Provitamin D₃, welches in der sich anschließenden thermischen Isomerisierung zu Vitamin D₃ und seinen Nebenprodukten Lumisterol und Tachysterol umgewandelt wird (HOLLICK und CLARK, 1978). 70-80 % des sich im Körper befindlichen Vitamin D₃ werden unter natürlichen Bedingungen in der Haut produziert (FLURY und HALDIMANN, 1981).

Besonders bei unzureichender Sonneneinstrahlung kann das Cholecalciferol nicht in ausreichender Menge gebildet, und muß deshalb mit der Nahrung zugeführt werden. Natürliche exogene Vitamin D₃-Quellen sind zum Beispiel Eidotter, Milchfett und Lebertran. Um den Bedarf an Vitamin D zu decken wird, da Vitamin D₂ und Vitamin D₃ im Körper in gleicher Weise verwertet werden, in einigen Ländern der Milch Vitamin D₂ zugesetzt. Die Milch ist zur Supplementierung besonders gut geeignet, da sie in der Nahrung die Hauptquelle für Calcium darstellt und Vitamin D die intestinale Calciumresorption steigert (MILLER, 1983). Eine in Amerika zur Deckung des Vitamin D-Bedarfs häufig verwendete Vitamin D₂-Quelle stellt die Brauereihefe (*Saccharomyces cerevisiae*) dar (NORMAN, 1979).

2.2 VITAMIN D₃ - METABOLISIERUNG IM KÖRPER

Das in der Haut gebildete Vitamin D₃ gelangt kontinuierlich in die Blutbahn. Da auch eine lange und intensive ultraviolette Bestrahlung zu keiner toxischen Manifestation im Körper führt, deutet dies auf eine kontrollierte Freisetzung hin (STANBURY et al., 1980).

Mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin D₃ wird zusammen mit den Fetten im Dünndarm absorbiert, in den Lymphgefäßen abtransportiert und gelangt über den ductus thoracicus und das Pfortadersystem in den Kreislauf. Bei einem zu hohen Angebot an Vitamin D₃ in der Nahrung wird dieses zunächst im Fettgewebe gespeichert (ROSENSTREICH et al., 1971).

Das mit der Nahrung aufgenommene oder in der Haut gebildete Vitamin D₃ wird im Blut an ein Vitamin D-Binding-Protein gebunden und zur Leber transportiert. Dort wird Vitamin D₃ vorwiegend in den Mitochondrien, in geringerem Maße auch in den Mikrosomen, durch ein "mixed function oxidase"-System, das Cytochrom P 450 enthält, zu 25(OH)D₃ hydroxyliert. Das so gebildete 25(OH)D₃ wird nun, wieder gebunden an das D-Binding-Protein, in die Niere transportiert. Hier findet in den Mitochondrien eine weitere enzymatische Hydroxylierung statt, deren Produkt das 1,25(OH)₂D₃ ist (HENRY und NORMAN, 1984).

Die Hydroxylierung des Cholecalciferols in der Leber unterliegt keiner Regulation, auch wenn das 25(OH)D₃ selbst eine gewisse Hemmwirkung auf die Cholecalciferol-25-Hydroxylase ausübt. Dies zeigt sich vor allem bei Vitamin D₃-Überdosierung, bei der es parallel zur verabreichten Vitamin D₃-Dosis zu einem Anstieg der 25(OH)D₃-Konzentration kommt, während die Konzentration an 1,25(OH)₂D₃ normal bleibt (KRUSE, 1985). Der 25(OH)D₃-Plasmaspiegel ist jedoch nur bis zu einer bestimmten Substratkonzentration direkt proportional zur Vitamin D₃-Zufuhr (MAWER, 1982). Möglicherweise wird durch 1,25(OH)₂D₃ die Aktivität der 25-Hydroxylase in der Leber herabgesetzt (BARAN und MILNE, 1983).

Die Hydroxylierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ in der Niere wird durch die 1α -Hydroxylase katalysiert und stellt den wichtigsten, durch eine Vielzahl von Faktoren sehr fein regulierten, Metabolisierungsschritt zu dem eigentlich stoffwechselaktiven Metaboliten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dar (HENRY und NORMAN, 1984).

Hauptregulatoren der Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sind der Serumcalcium- und Serumphosphatspiegel und das Parathormon. Eine Hypocalcämie führt über die Ausschüttung von Parathormon (KREMER und GOLTZMAN, 1982), eine Hypophosphatämie wahrscheinlich direkt (BAXTER und DeLUCA, 1976; DeLUCA und GHAZARIAN, 1980), zu einer Steigerung der Aktivität der renalen 1α -Hydroxylase. Die gonadotropen Hormone (Östrogene, Progesteron und Testosteron), sowie Prolaktin und Insulin, stimulieren ebenfalls das 1α -Hydroxylasesystem (HENRY und NORMAN, 1984). Eine Überproduktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird durch eine Produkthemmung des Enzyms verhindert. In hohen Konzentrationen induziert $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Bildung der 24 -Hydroxylase (DeLUCA, 1981). Aus $25(\text{OH})\text{D}_3$ entsteht dann vermehrt ein anderer Vitamin D-Metabolit, das $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Die physiologische Rolle von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist stark umstritten. Mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kombiniert besitzt es eine synergistische Wirkung (RAMBECK und ZUCKER, 1985).

In geringen Mengen findet die 25 -Hydroxylierung von Vitamin D_3 auch außerhalb der Leber in Lunge, Darm und Niere statt (DeLUCA und SCHNOES, 1983). Die Aktivität der $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α -Hydroxylase konnte neben der Niere noch im Placentagewebe des Menschen in vivo (GRAY et al., 1979) und bei der Ratte in vitro (TANAKA et al., 1979) nachgewiesen werden. Außer in der Niere und Plazenta scheint es unter physiologischen Bedingungen keinen weiteren Syntheseort für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu geben (REEVE et al., 1983).

Vitamin D_3 , $25(\text{OH})\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ werden im Plasma an das in der Leber synthetisierte Vitamin D-Binding-Protein gebunden. Die höchste Bindungsaffinität besteht für $25(\text{OH})\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (HADDAD und WALGATE, 1976).

2.3 PHYSIOLOGISCHE WIRKUNGEN VON VITAMIN D₃

Vitamin D₃ wird als Prohormon bezeichnet. Aktive Folgeprodukte wirken als Steroidhormone und induzieren die Proteinsynthese. 1,25(OH)₂D₃ entspricht der klassischen Hormondefinition. Die Niere fungiert als endokrines Organ, über das Blut erreicht der Metabolit seinen Wirkungsort. Dort dringt dieses "D-Hormon" in die Zielzelle ein und wird an ein cytoplasmatisches Rezeptorprotein gebunden. Dieser Hormon-Rezeptor-Komplex wandert in den Zellkern und induziert durch Transkription und Translation die für die biologische Antwort notwendige Proteinsynthese (HENRY und NORMAN, 1984). Rezeptoren für 1,25(OH)₂D₃ befinden sich in den klassischen Zielorganen Darm, Knochen und Niere. Dort entfaltet dieses Hormon dann seine Wirkung, die in ihrer Gesamtheit bei Vögeln und Säugern die Calciumhomöostase garantiert. Aber auch in einer Vielzahl anderer Gewebe wie z.B. Nebenschilddrüse, Pankreas, Hypophyse, Haut, Gehirn, Milchdrüse, Plazenta und Thymus konnten Rezeptoren nachgewiesen werden. Über die in diesen Organen ausgeübte Funktion von 1,25(OH)₂D₃ ist bislang noch sehr wenig bekannt (DeLUCA und SCHNOES, 1983).

Vitamin D-Mangel führt zu einer stark verminderten Absorption von Calcium und Phosphor aus dem Nahrungsbrei, die Serumkonzentrationen fallen. Dies kann zu neuromuskuläre Störungen, Tetanien und schlaffen Lähmungen führen. Die Knochenmineralisation wird gestört, Rachitis und Osteomalazie sind die Folge. Neben diesen Symptomen findet man bei Vitamin D-Mangel auch ein vermindertes Wachstum, Anämie, Myelofibrose (YETGIN und OZSOYLU, 1982), vermehrte Infektionsanfälligkeit und gestörte Leukozytenphagozytose (STRÖDER und KASAL, 1970).

Die Vitamin D₃-Wirkungen am Darm sind am besten untersucht worden. Unter der Einwirkung von 1,25(OH)₂D₃ wird die intestinale Absorption von Calcium und Phosphat stark erhöht. Die Calciumaufnahme hat einen biphasischen Charakter. Dies läßt vermuten, daß es sich um zwei verschiedene Transportmechanismen für Calcium handelt (HALLORAN und DeLUCA, 1981). Bei

dem ersten Resorptionsmaximum nach 6-8 Stunden soll es sich um die Antwort der Epithelzellen der Darmzotten nach vorhergehender Proteinsynthese handeln (FRANCESCHI und DeLUCA, 1981), während das zweite Maximum nach 24-48 Stunden die Antwort der Epithelzellen der Krypten darstellt (DeLUCA und SCHNOES, 1983). Der am besten meßbare Ausdruck der Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an der Dünndarmmucosa ist die Induktion des calciumbindenden Proteins (CaBP). Der Gehalt der Mucosa an CaBP ist mit der Calciumabsorption gut korreliert (WASSERMAN et al., 1968). Die genaue Funktion des Proteins konnte noch nicht geklärt werden. Die wahrscheinliche Aufgabe liegt in der Bindung des Calciums innerhalb der Zelle während des Transportes von der Bürstenzellmembran zu der Basalmembran. Toxische Konzentrationen könnten so in den resorbierenden Zellen vermieden werden (WASSERMAN und FULLMER, 1983). Die Phosphataufnahme ist ebenfalls biphasisch (KABAKOFF et al., 1982).

Wenig ist über die Wirkung am Knochen bekannt. Ein direkter Einfluß von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Knochenmineralisation konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Der fördernde Einfluß ist vielleicht eher im Sinne einer Bereitstellung von Calcium und anorganischem Phosphor für die Chondroblasten und Osteoblasten der neu zu bildenden Matrix zu sehen. Kontinuierliche, die physiologischen Plasmakonzentrationen aufrechterhaltende, Calcium- und Phosphatinfusionen riefen bei Vitamin D - freien Ratten eine korrekte Mineralisation der Knochen hervor (UNDERWOOD und DeLUCA, 1984; WEINSTEIN et al., 1984).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimuliert direkt die Zahl und Aktivität der Osteoklasten, nur leicht erhöhte Plasmakonzentrationen führen bereits zu einer Steigerung der Knochenresorption (HOLTROP et al., 1981). Die Mobilisierung von Calcium aus dem Knochen ist nur in Gegenwart von Parathormon möglich (GARABEDIAN et al., 1974). Möglicherweise wird durch das D-Hormon eine Differenzierung der Osteoklasten aus Makrophagen provoziert und so der ständige physiologische Umbau im Knochen gesteuert (TANAKA et al., 1982).

Ein weiteres wichtiges Zielorgan von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist die Niere, über die Wirkung an diesem Organ weiß man erst wenig. Der Effekt von Vitamin D_3 auf die Nierentubuli scheint zweifach zu sein: zum einen wird die tubuläre Reabsorption von Calcium gefördert, zum anderen wird die Ansprechbarkeit der Tubuli auf das Parathormon gesteigert (YAMAMOTO et al., 1984). Das Parathormon bewirkt ebenfalls eine Erhöhung der renalen Calciumresorption, die Phosphatresorption wird jedoch gehemmt.

Der Einfluß von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die renale Exkretion und tubuläre Rückresorption von Phosphat variiert. Leicht hyperphosphatämische Ratten, die mit D-Hormon behandelt wurden reagierten darauf mit einer Hyperphosphaturie (BONJOUR et al., 1977). Bei Ratten die eine Hypophosphatämie aufwiesen, führte die Behandlung zu einer gesteigerten tubulären Reabsorption (COSTANZO et al., 1974).

Pharmakologische Dosen von Vitamin D_3 führen auch ohne begleitende Hypercalcämie zur Hypercalciurie (LITVACK et al., 1958). Durch die klinische Anwendung von Vitamin D_3 kommt es zu einer gesteigerten Absorption von Calcium im Darm, die Mobilisierung von Calcium aus dem Knochen und die tubuläre Reabsorption ist erhöht. Dadurch steigt die Serumcalciumkonzentration an, mehr Calcium wird in der Niere filtriert und das Ergebnis ist nach Sättigung des Reabsorptionsmechanismus eine höhere Ausscheidung von Calcium im Urin (NORMAN, 1979).

2.4 METABOLISIERUNG UND PHYSIOLOGISCHE WIRKUNGEN VON VITAMIN D_2

An der Metabolisierung von Vitamin D_2 sind die gleichen Enzymsysteme wie bei Vitamin D_3 beteiligt. Durch 25-Hydroxylierung wird in der Leber $25(\text{OH})\text{D}_2$ gebildet und dieses in der Niere am Kohlenstoffatom C-1 zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ hydroxyliert (JONES et al., 1976a,b). Da Vitamin D_2 in gleicher Art und Weise wie Vitamin D_3 metabolisiert wird, nahm man auch eine identische Wirkungsweise der beiden Vitamine und ihrer Meta-

bolite an.

Untersuchungen an der Ratte zeigten, daß die antirachitischen Eigenschaften von Vitamin D₂ und Vitamin D₃ (NAPOLI et al., 1979), diejenigen von 1,25(OH)₂D₂ und 1,25(OH)₂D₃ (RAMBECK et al., 1984) sowie die von 1α(OH)D₂ und 1α(OH)D₃ (SJÖDEN et al., 1984b) jeweils gleich sind.

2.5 VITAMIN D₂ UND VITAMIN D₃ BEI VERSCHIEDENEN TIERARTEN

Noch bis vor kurzem galt die Annahme, daß Vitamin D₂ und Vitamin D₃ beim Menschen, sowie bei allen Säugern, eine identische antirachitische Wirkung besitzen (NORMAN, 1979). Die einzige Ausnahme davon bildeten die Neuweltaffen; sie diskriminieren gegen Vitamin D₂ (HUNT et al., 1967).

Bei Vögeln ist das Vitamin D₂ verglichen mit dem Vitamin D₃ 10 bis 100 Mal weniger aktiv (CHEN und BOSMANN, 1964). Die Ursache für diese geringere Wirksamkeit von Vitamin D₂ könnte eine raschere Metabolisierung und Eliminierung der Vitamin D₂-Komponenten aus dem Kreislauf sein (IMRIE et al., 1967).

Der Grund dafür, daß Vögel und Neuweltaffen das Vitamin D₂ nur schlecht verwerten können, scheint die zusätzliche Methylgruppe am C-24 Atom des Ergocalciferols zu sein (HOLLIS, 1984).

In jüngster Zeit wurde jedoch auch von Unterschieden zwischen den beiden Vitaminen bei anderen Säugerspezies berichtet.

So können Schweine und Kälber Vitamin D₃ etwas besser verstoffwechseln, während Ratten gegen Vitamin D₃ zu Gunsten von Vitamin D₂ diskriminieren (HORST et al., 1982; SOMMERFELDT et al., 1983).

Bei Pferden und Milchkühen ist Vitamin D₃ im Gegensatz zum Vitamin D₂ aktiver (HARRINGTON und PAGE, 1983; LITLEDIKE und HORST, 1982).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Säugetiere anscheinend generell zwischen den beiden Vitaminen D₂ und D₃ unterschei-

den, wenn sie es nicht qualitativ tun, dann zumindest doch quantitativ.

Beim Menschen wurde ebenfalls von einer unterschiedlichen Wirkung der beiden Vitamine berichtet. Humanmedizinische Untersuchungen ergaben, daß unter dem Einfluß von Vitamin D₂ bei bestimmten Osteomalazien ("antikonvulsive Osteomalazien") die Knochenmasse deutlich stärker zunimmt, als bei adäquater Menge an Vitamin D₃ (TJELLESEN et al., 1985a). Die Behandlung mit Vitamin D₂ und Vitamin D₃ führt bei der durch Langzeittherapie mit Antikonvulsiva entstandenen Osteomalazie zu verschiedenen Serumkonzentrationen der Vitamin D-Metabolite (TJELLESEN et al., 1985b; HAHN et al., 1983). Ob dies auf eine unterschiedliche Metabolisierung aufgrund einer Beeinflussung durch die Antikonvulsiva oder auf die Krankheit an sich zurückzuführen ist, oder generell besteht, ist noch zu klären.

Große Aufmerksamkeit erlangten neuere Untersuchungen die zeigten, daß die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₂ und Vitamin D₃ in der Leber in vitro in unterschiedlichem Maße erfolgt, denn das könnte eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Wirkungsweise von Vitamin D₂ und D₃ darstellen. Die mitochondrale und mikrosomale Cytochrom P-450 Fraktion in der Rattenleber katalysiert die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ effizienter als diejenige von Vitamin D₂ (ANDERSSON et al., 1983; HOLMBERG, 1984). Die im Gegensatz zum Vitamin D₃ geringere 25-Hydroxylierung von Vitamin D₂ könnte die Ursache für die geringere Toxizität von Vitamin D₂ bei Ratte, Pferd und Affe darstellen (HOLMBERG et al., 1986). Nach HOLMBERG et al. (1986) ist auch beim Menschen die Hydroxylierungsrate von Vitamin D₃ höher als diejenige von Vitamin D₂. Die sich daraus ergebenden unterschiedlichen Serumkonzentrationen, zusammen mit der Erkenntnis, daß die Wirkungen von Vitamin D₂ und Vitamin D₃ differieren zeigen, daß beim therapeutischen Einsatz der D-Vitamine bzw. ihrer Metabolite neue Wege beschritten werden können.

2.6 THERAPEUTISCHER EINSATZ VON VITAMIN D UND SEINEN METABOLITEN

Durch die Entwicklung neuer Produktionsverfahren (PAAREN et al., 1980) konnte die synthetische Herstellung einzelner Metabolite und Strukturanaloger kostengünstiger und mit höherer Ausbeute erfolgen. Dadurch ist auch die Behandlung von Knochenmineralisationsstörungen und Hypocalcämien im Wandel begriffen. Trotz Applikation hoher Dosen trat die Wirkung von Vitamin D nämlich häufig erst nach Wochen bis Monaten auf, einige Erkrankungen erwiesen sich sogar als therapieresistent (KRUSE, 1985).

Mit der Anwendung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist eine schnellere und gezieltere Wirkung möglich. Die kurze Halbwertszeit ermöglicht sowohl bei Unter - als auch bei Überdosierung eine schnelle Dosisanpassung. Der Regulationsmechanismus der $25(\text{OH})\text{D}-1\alpha$ -Hydroxylase wird durch Einsatz von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ umgangen. Problematisch ist jedoch die geringe therapeutische Breite von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (siehe 2.7).

Der therapeutische Einsatz von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ sollte, sofern keine Umsatzstörung in der Leber besteht und es rasch zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hydroxyliert wird, die gleichen der oben erwähnten Vorteile bieten. Hinsichtlich der therapeutischen Breite gibt es bislang noch widersprüchliche Meinungen (vgl. 2.7). Vitamin D_2 -Metabolite sind auf dem Arzneimittelmarkt noch nicht zugelassen.

Zur Behandlung mit Vitamin D, D-Hormon und synthetischem Analog gibt es zwei Indikationen, die Hypocalcämie und Knochenmineralisationsstörungen, beides sind Symptome verschiedener Grundkrankheiten (KRUSE und KUHLENCORDT, 1980). Im folgenden wird auf einige klinisch bedeutsame Osteomalazieformen eingegangen, welche durch Vitamin D-Mangel, D-Stoffwechselstörungen oder Rezeptordefekte verursacht sein können. Während die meisten Formen der Hypocalcämie und Mineralisationsstörungen mit pharmakologischen Dosen Vitamin D oder Vitamin D_3 -Metaboliten behandelt werden können, sind bei Vitamin D-Stoffwechselstörungen häufig nur die bereits hydroxylierten Metabolite wirksam.

Vitamin D-Mangel kann durch unzureichende ultraviolette Bestrahlung, mangelhafte orale Vitamin D-Zufuhr sowie Malabsorption (z.B. Gallengangsverstopfung) und Maldigestion (z.B. Steatorrhoe) verursacht sein (PARFITT et al., 1982). Die Vitamin D-Mangelkrankheit ist charakterisiert durch die fehlende Mineralisation des neu gebildeten Knorpels und der organischen Knochenmatrix. Im jugendlichen Organismus bezeichnet man diese Form als Rachitis, beim Erwachsenen als Osteomalazie. Die durch Vitamin D-Mangel verursachten Störungen der Knochenmineralisation werden mit Vitamin D oder den Vitamin D₃-Metaboliten therapiert.

Zu den Vitamin D-Stoffwechselstörungen gehören zunächst die Bildungsstörungen von 25-Hydroxycholecalciferol.

Dies kann die Folge chronischer Leberentzündungen sein (LONG et al., 1976), aber auch medikamentöse Ursachen haben. So führt die Langzeitbehandlung mit Antikonvulsiva (z.B. Phenobarbital, Diphenylhydantoin) über Bildungsstörungen von 25(OH)D₃ zu einer mangelhaften Knochenmineralisation (HAHN et al., 1980). Therapeutisch wurden hohe Dosen Vitamin D₃ oder 1,25(OH)₂D₃ eingesetzt. Neuere Untersuchungen zeigten, daß unter Einfluß von Vitamin D₂ und Antikonvulsiva die Knochenmasse bei Patienten mit Epilepsie stärker zunimmt als bei entsprechender Vitamin D₃ Therapie (TJELLESEN et al., 1985a).

Bei der hereditären Pseudo-Mangelrachitis Typ I handelt es sich um einen erblichen Mangel an der 25(OH)D₃-1 α -Hydroxylase, der durch Gaben von 1,25(OH)₂D₃ oder 1 α (OH)D₃ erfolgreich therapiert werden kann (FRASER et al., 1973; BALSAN et al., 1977).

Beim Typ II liegt dagegen ein Rezeptordefekt vor. Trotz hoher Plasmaspiegel von 1,25(OH)₂D₃ und Parathormon bleibt die Hypocalcämie bestehen. Die Zielorgane sind unempfindlich für 1,25(OH)₂D₃. Nur hohe Dosen 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ führen in Einzelfällen zu Erfolgen (DeLUCA und GHAZARIAN, 1980; vgl. aber Kapitel 2.7).

Die Bedeutung der Vitamin D-Metabolite in der Humanmedizin liegt vor allem in der Therapie der renalen Osteopathien. Hier wird die fehlende oder unzureichende Nierenhydroxylierung durch die Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bzw. $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ kompensiert. Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz entwickeln auf Grund der Unfähigkeit entsprechende Mengen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu bilden, Osteomalazie und einen sekundären Hyperparathyreoidismus. Die durch die geringe Verfügbarkeit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bedingte enorme Ausschüttung von Parathormon führt zu massiven Knochenerosionen (DeLUCA und GHAZARIAN, 1980). Die Therapie der renalen Osteodystrophie mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ verstärkt jedoch die infolge der Urämie schon bestehenden Weichgewebsverkalkungen (TEDEGAARD et al., 1983). Mit einer beschleunigten Verschlechterung der Nierenfunktion ist zu rechnen (NIELSEN et al., 1980).

Ursachen für weitere Bildungsstörungen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stellen der Hypo- oder Pseudohypoparathyreoidismus dar. Als Hypoparathyreoidismus bezeichnet man die mangelnde Ausschüttung von Parathormon aus den Nebenschilddrüsen bei Vorliegen einer Hypocalcämie. Daraus resultiert ein verminderter $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Plasmaspiegel, durch die bestehende Hyperphosphatämie wird die Neubildung von 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 noch weiter gehemmt.

Beim Pseudohypoparathyreoidismus dagegen ist die Niere unempfindlich, auf den stimulierenden Reiz von Parathormon mit der Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu reagieren. Aufgrund des niedrigen Plasmaspiegels an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ entwickelt sich eine Hypocalcämie. Eine Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ ist in beiden Fällen wirksam (KOOH et al., 1975).

Die Osteoporose stellt eine weitere mögliche Indikation zur Therapie mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ oder $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dar.

Diese Erkrankung ist durch eine Verminderung der Knochenmasse gekennzeichnet und tritt bei beiden Geschlechtern auf. Im Alter (etwa ab dem 50. Lebensjahr) überwiegt die Knochenresorption die Knochenneubildung. Die Plasmakonzentration von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist vermindert und folglich die Absorption von Calcium im Darm reduziert (GALLAGHER et al., 1980). Frauen

sind besonders betroffen, da im Klimakterium der stimulierende Effekt der Östrogene auf die renale 1α -Hydroxylase entfällt. Diese Form der Skeletterkrankung wird als postmenopausale Osteoporose bezeichnet. Sie tritt bei ca. 25 % aller Frauen auf (SIMONEN, 1986).

Hypercortisonismus (nach Langzeitbehandlung mit Cortison oder Morbus Cushing) hat ebenfalls einen starken Knochengewichtsverlust zur Folge (HAHN, 1978). Die reduzierte intestinale Calciumabsorption führt zur Hypocalcämie, was wiederum einen Parathormonanstieg zur Folge hat (FUCIK et al., 1975; HAHN et al., 1981). Die Ursache für die verminderte Calciumaufnahme aus dem Darm bleibt umstritten. Wissenschaftler berichten von normalen (SEEMAN et al., 1980) oder herabgesetzten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Plasmakonzentration (CHESNEY et al., 1978). Eine Therapie mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ oder $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verbessert die intestinale Calciumabsorption (KLEIN et al., 1977; LINDGREN et al., 1978). Bei Behandlung des Hypercortisonismus mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ wird jedoch die Gefahr der Nephrocalcinose verstärkt (SJÖDEN und LINDGREN, 1985a), eine Therapie mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ wäre möglicherweise günstiger (SJÖDEN et al., 1985b). Bei Anwendung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nimmt trotz zunehmender Calciumresorption und dadurch unterdrückter Parathormonsekretion die Knochenmasse nicht zu (DYKMAN et al., 1984).

In der Tiermedizin werden Vitamin D und seine Metabolite ebenfalls angewendet. So wird Vitamin D zur Milchfieberprophylaxe eingesetzt, da Milchleistungskühe in den ersten Tagen der Laktation einen stark erhöhten Calciumbedarf haben. Die Verabreichung von Vitamin D_3 bringt jedoch nicht den erwünschten Erfolg, da die Spanne zwischen toxischer und uneffektiver Dosis bei parenteraler Verabreichung von Vitamin D_3 zu eng ist (LITTLEDIKE und HORST, 1982). Die Anwendung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ ist erfolgreich (NORMAN et al., 1982b). Vitamin D_3 wird dem handelsüblichen Geflügelfutter, Vitamin D_2 dem Schweine- und Rinderfutter zugesetzt. Es ist bei den Säugern für ein Maximum an Fertilität und effizienter Reproduktion von Bedeutung (DeLUCA und SCHNOES, 1983).

Bei Hühnern ist Vitamin D₃ für die Eiproduktion und eine hohe Schlupfrate notwendig. 1,25(OH)₂D₃ ist hierbei nur in Kombination mit 24,25(OH)₂D₃ genauso wirksam wie das Vitamin D₃ (NORMAN, 1979).

2.7 TOXIZITÄT VON VITAMIN D UND SEINEN METABOLITEN

Die Plasmakonzentration von Vitamin D₃ beträgt 1-6 ng / ml (SHEPARD et al., 1979). Ist dieser Wert erreicht, so wird bei höherer exogener Vitaminzufuhr das Vitamin D zunächst im Fettgewebe gespeichert (ROSENSTREICH et al., 1971). Durch Langzeitbehandlung mit Vitamin D oder bei Vitamin D-Überdosierung wird dieser Speichermechanismus erschöpft, der Vitamin D- Gehalt im Plasma steigt plötzlich drastisch an. Das Vitamin D wird in der Leber hydroxyliert, eine stark erhöhte Plasmakonzentration an 25(OH)D ist die Folge. Der Plasmaspiegel von 1,25(OH)₂D bleibt normal oder ist geringfügig erhöht (HUGHES et al., 1976; MAWER et al., 1985).

Am Beispiel einer Vitamin D₃-Intoxikation konnte gezeigt werden, daß durch die hohe Konzentration an 25(OH)D₃, 1,25(OH)₂D₃ vom Rezeptor verdrängt wird. 25(OH)D₃ besetzt selbst die Rezeptoren an den Zielorganen was eine extensive Demineralisation der Knochen, eine zunehmende intestinale Absorption von Calcium mit daraus resultierender Hypercalcämie und Nephrocalcinose zur Folge hat (FRASER, 1981). Die Hypercalcämie kann, auch wenn die Vitamin D₃-Aufnahme sistiert, noch über Wochen und Monate bestehen bleiben, da Vitamin D₃ nur langsam aus dem Fettgewebe freigesetzt wird und die Halbwertszeit von 25(OH)D₃ im Plasma 12 - 30 Tage beträgt (MILLER, 1983). Die Lebenserwartung von Patienten mit überstandener Vitamin D-Vergiftung ist aufgrund von Bluthochdruck und Nierenschädigung vermindert (DAVIES und ADAMS, 1978).

Die Therapie der Vitamin D-Intoxikation beinhaltet eine verminderte orale Calciumaufnahme und die Verabreichung von Glucocorticoiden (VERNER, 1958). Diese vermindern die Aktivität der 1 α -Hydroxylase, dadurch sinkt die Plasmakonzentra-

tion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, die intestinale Calciumresorption und Mobilisierung von Calcium aus den Knochen ist reduziert (BLAHOS et al., 1983). Die Calciumausscheidung über den Harn nimmt weiter zu (GALLAGHER et al., 1973).

Die Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Organismus unterliegt einer engen Regulation (vgl. Kapitel 2.2). Plasmakonzentrationen von nur 30-50 pg / ml (HAUSSLER et al., 1976) bei einer Halbwertszeit von 10 Stunden (GRAY et al., 1978) wurden gemessen. Beim therapeutischen Einsatz von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird der Regulationsmechanismus der 1α -Hydroxylase umgangen. Die Substitution von D-Hormon muß dann so erfolgen, daß eine wirksame, aber nicht toxische, Plasmakonzentration auftritt. Dieser Konzentrationsbereich wird als therapeutische Breite bezeichnet, die bei $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sehr gering ist (FLURY und HALDIMANN, 1981). Im allgemeinen werden in der Humanmedizin tägliche Dosen von 0.25-2 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ angewendet. Schon bei Überschreitung der wirksamen Konzentration um 50 % können nierentoxische und calcinogene Effekte auftreten. Bei nur leicht erhöhten Konzentrationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Serum wird die Knochenresorption gesteigert. Die sich bei Behandlung mit D-Hormon schnell entwickelnde Hypercalcämie macht ständige Serum- und Harnkontrollen notwendig (KRUSE, 1985).

Die relative Toxizität der nur am Kohlenstoffatom C- 1α hydroxylierten Komponenten ist noch wenig erforscht. Da $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ in der Leber hydroxyliert wird, die ubiquitäre 25-Hydroxylase keiner engeren Regulation unterliegt, können hohe Konzentrationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ gebildet werden. Die therapeutische Breite von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ müßte demnach gleich sein. In der Literatur wurde jedoch sowohl von einer geringeren, als auch von einer höheren Toxizität des einfach hydroxylierten Analoges berichtet (VOIGTS et al., 1983; CROCKER et al., 1985). Möglicherweise wird $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ doch durch ein anderes in der Leber befindliches Enzymsystem als Vitamin D umgesetzt (FUKUSHIMA et al., 1978) oder aber, ein bestehender Puffermechanismus ist die Ursache für die unterschiedliche therapeutische Breite von $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

Vergleicht man die jeweiligen D_2 - und D_3 - Analoge miteinander, so zeigt sich, daß $1\alpha(OH)D_3$ bei der Ratte 5 bis 10 Mal toxischer ist als $1\alpha(OH)D_2$ (SJÖDEN et al., 1985c). Die höhere Toxizität von $1\alpha(OH)D_3$ könnte eventuell dadurch zustande kommen, daß sich entsprechend der effektiveren 25-Hydroxylierung von Vitamin D_3 (ANDERSON et al., 1983; HOLMBERG, 1984) größere Fluktuationen in der Serumkonzentration von $1,25(OH)_2D_3$ ergeben, die ein größeres Risiko der Toxizität bedeuten.

Die Knochencalciummobilisierung von $1\alpha(OH)D_2$ ist geringer als diejenige von $1\alpha(OH)D_3$ (SJÖDEN 1984a), dies könnte eine geringere Toxizität der D_2 -Komponente bedeuten. Da $1\alpha(OH)D_2$ zu $1,25(OH)_2D_2$ hydroxyliert wird, könnte die geringere Mobilisierung von Calcium aus den Knochen auch für $1,25(OH)_2D_2$ gelten. Die beiden Vitamin D_2 -Metabolite würden somit eine gute Alternative zur Behandlung von Knochenerkrankungen darstellen.

2.8 VERKALKENDE WIRKUNG VON VITAMIN D UND VITAMIN D-METABOLITEN AUF DAS GEFÄß - UND ORGANSYSTEM

2.8.1 AUFTRETEN VON WEICHGEWEBSVERKALKUNGEN

In hohen Dosen oder bei Vorliegen prädisponierender Faktoren auch bei niedrigen Dosierungen führt Vitamin D zu Kalkablagerungen in den sogenannten calcinophilen Geweben d.h. in den Basalmembranen der säuereausscheidenden Gewebe (Niere, Lunge, Magen) und in den elastischen Fasern (Gefäße). Als prädisponierend kommen vor allem solche Zustände in Frage, die mit einer Hypercalcämie einhergehen z.B. ein Überangebot von Calcium in der Nahrung, Hyperparathyreoidismus, renale Osteopathien oder Cushingsyndrom. Am frühesten und heftigsten sind die Nieren, dann Aorten und geringer Herz, Magen, Lunge, periphere Arterien, periphere Muskulatur, inkretorische Drüsen und letztendlich die peripheren Venen verkalkt (LINDT, 1968).

2.8.2 PATHOGENESE UND MORPHOLOGIE DER VERKALKUNGEN

Man unterscheidet bei der Entstehung von Gewebsverkalkungen zwei verschiedene Pathogeneseformen. Zum einen die primäre metastatische Form der Verkalkung, zum anderen die sekundäre dystrophische Form.

Im Falle der durch D-Hypervitaminose entstandenen Calcifikationen handelt es sich meist um eine metastatische Verkalkung. In der Niere treten sie im Bereich der tubulären Basalmembranen, Bowmanschen Kapsel, im Interstitium und in den Gefäßwänden auf. Eiweißkalkzylinder vor allem in den distalen Tubuli können die Tubulusepithelien mechanisch schädigen (WEISS, 1983). Makroskopisch stellen sich diese Verkalkungen der Niere in Form von feinen weißen Stippchen oder meist radial angeordneten Streifen dar.

Bei der metastatischen Verkalkung der Gefäße sind zunächst die elastischen Elemente betroffen, an denen sich eine knopf-, platten-, oder wabenförmige Kalkinkrustierung vollzieht. So ist gut zu verstehen, daß in großen Gefäßen regelmäßig die elasticareiche Media verkalkt, in den kleinen Arterien dagegen mehr die Lamina elastica interna. Eine generalisierte Verhärtung des Arteriensystems, verknüpft mit sekundären Intimasklerosen bezeichnet man als Calcinose, im Sinne der Definition von Dahme auch als Arteriosklerose (DAHME, 1983). "Reibeisenartige" Veränderungen treten am herznahen Aortenbogen zuerst auf, dehnen sich dann über die Aorta thoracica nach der Aorta abdominalis und in einzelnen Fällen bis in die äußerst peripheren Arterien aus.

Mikroskopisch sichtbare Kalkablagerungen in den sogenannten calcinophilen Geweben beginnen fein staubförmig und werden mit fortschreitender Dauer der Erkrankung größer, körnig bis brockig und breiten sich dann ins umliegende Gewebe aus (LINDT, 1968). Mit Hilfe der "von Kossa" Färbung wird gezeigt, daß es sich bei diesen Ablagerungen wirklich um Kalksalze und nicht um anderweitig basophile Substanzen handelt.

Die durch eine Hypervitaminose D entstandenen morphologischen Veränderungen der Weichgewebe beim Kaninchen wurden in der Literatur bereits ausführlich beschrieben (HASS et al., 1960; STEVENSON et al., 1976).

2.8.3 BIOCHEMISCHER VORGANG DER VERKALKUNG AM ELASTIN

Früher nahm man eine ionogene Bindung des Calciums an. Da jedoch im Elastin gar nicht genügend geladene Aminosäuren vorhanden sind wurde folgendes Modell für die Verkalkung der Gefäße über ungeladene Bindungsstellen entwickelt (URRY, 1971). Etwa ein Drittel aller Aminosäuren im Elastin sind unpolare Glycine. Die dadurch bedingte Konformationseigentümlichkeit im Elastin und Kollagenmolekül schafft neutrale, ungeladene Bindungsstellen für Calciumionen. Dabei tritt eine Wechselwirkung zwischen den Kationen (hier Ca^{2+}) und den neutralen Gruppen der Proteinmatrix auf. Die positiv geladenen Calciumionen ziehen ihrerseits zur Neutralisation Phosphat - und Carbonationen an, wodurch die Möglichkeit der Anlagerung weiterer Calciumionen geschaffen wird. Auf diese Weise entstehen Kristallisationskerne für die Bildung kristalliner Ablagerungen im betreffenden Weichgewebe.

Nach Regal (REGAL, 1982) handelt es sich bei der Verkalkung von Geweben um einen charakteristischen pathophysiologischen Vorgang, der ohne vorherige Zellschädigung in Gang kommt und sich hierdurch von der dystrophischen Form der Verkalkung unterscheidet. Die durch übermäßige Vitamin D_3 -Gaben hervorgerufene erhöhte unkontrollierte Calciumresorption am Darm und Mobilisation von Calcium aus dem Knochen zwingt den Körper, neue extraossäre Pools im Gewebe zu schaffen. Dort kommt es zu einer Stimulation der Produktion von Grundsubstanz, d.h. zu einer vermehrten Bildung von Proteoglykanen, in die dann nachfolgend Kalksalze eingelagert werden, was schließlich zur extraossären Verkalkung führt.

2.8.4 ENTSTEHUNG DER URÄMIE

Vitamin D bzw. D-Metabolit - Überdosierung führt mit zunehmender Hypercalciurie und erschöpftem tubulärem Reabsorptionsmechanismus zur Ablagerung von Calcium im Nierengewebe (NORDIN, 1973).

Durch das Auftreten von Kalkzylindern in den Nierentubuli und Epithelzellen kommt es zur fortschreitenden Verminderung der glomerulären Filtrationsrate und einer Retention harnpflichtiger Stoffe. Die urämischen Toxine schädigen direkt die Parenchymzellen und führen zu einer Erhöhung der Kapillarpermeabilität. Dadurch gelangen auch retinierte harnpflichtige Substanzen in die Gewebe und an die Oberfläche von Schleimhäuten. Auf diesen entsteht unter der Einwirkung der Urease, die von den auf den Schleimhäuten lebenden Bakterien gebildet wird, Ammoniak. Dieser reizt die Schleimhäute, so daß es zu Entzündungen kommt (WEISS, 1983).

Die Tiere zeigen Gewichtsverlust, Polydipsie, Polyurie, Kot mit Beimengungen von reichlich klarem mucösem Sekret, ihr Bewußtsein ist getrübt. Bei der Sektion fällt der starke ammoniakalische Geruch der Schleimhäute von Magen und Darm auf (urämische Gastritis und Enterocolitis). Verkalkungen in der Magenschleimhaut, in allen Abschnitten der Magenwand und den oberen Dünndarmabschnitten treten auf. Nicht immer ist die Niere makroskopisch verändert. Auch Verkalkungen im Gefäßsystem sind bei raschem Urämietod nicht pathognomonisch.

2.9 DIE CALCIUMHOMÖOSTASE DES KANINCHENS

Kaninchen weisen im Vergleich mit anderen Spezies einige Besonderheiten im Calcium - Stoffwechsel auf.

Anders als bei Rind, Schaf oder Hund wird offenbar beim Kaninchen, im Falle eines Überangebotes an Calcium im Futter, der Calciumzufluß aus dem Verdauungskanal nicht entsprechend dem Bedarf reguliert. Mit steigender Calciumaufnahme nimmt die scheinbare Verdaulichkeit stark zu. Diese Besonderheit

im Calciumstoffwechsel ist allerdings nicht nur auf das Kaninchen beschränkt, sondern tritt auch bei anderen Dickdarmverdauern (Pferd, Meerschweinchen und Hamster) auf (KAMPHUES et al., 1986).

Die Calciumkonzentration im Plasma variiert in Abhängigkeit von der Versorgung, so können beim Kaninchen im Vergleich zu anderen Säugern ungewöhnliche hohe Plasmaspiegel auftreten (CHAPIN und SMITH, 1967). Nach KAMPHUES et al. (1986) führt eine forcierte Calciumaufnahme nur bei adulten Tieren zu einem Anstieg des Calciumgehaltes im Blutplasma.

Das im Überschuß absorbierte Calcium wird vermehrt renal ausgeschieden (CHEEKE und AMBERG, 1973). Die bei übermäßiger Calciumaufnahme vorwiegend renale Exkretion erscheint gerade für Spezies mit Koprophagie eine sehr sinnvolle Maßnahme, denn im Falle einer faekalen Exkretion würde ein Teil über die Reingestion erneut zur Elimination anfallen (KAMPHUES et al., 1986).

Die Calciumkonzentration im Plasma unterliegt beim Kaninchen im Gegensatz zu anderen Säugern keiner so engen Regulation. Wie bei den anderen Spezies bewirken Parathormon und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ einen Anstieg der Calciumkonzentration, durch Ausschüttung von Calcitonin aus den parafollikulären Zellen der Schilddrüse kann bei erhöhten Plasmawerten eine Gegenregulation eingeleitet werden. Nach Berechnungen von Lee ist jedoch beim Kaninchen bei Calciumgehalten von $< 12.7 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$ kein Calcitonin mehr im Plasma zu erwarten, während andere Spezies auch bei Werten von $8 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$ eine Basissekretion von Calcitonin zeigen (LEE et al., 1969). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die vergleichsweise hohe Calciumkonzentration im Plasma sein (KAMPHUES et al., 1986).

Das Gefäßsystem der Kaninchen erweist sich als besonders anfällig für Verkalkungen (LINDT, 1968; DIRKSEN et al., 1972; KAMPHUES et al., 1986). Das häufige Auftreten von Spontanverkalkungen beim Kaninchen ist auf einen zu hohen Gehalt des handelsüblichen Alleinfutters an Calcium und Vitamin D zurückzuführen (FISCHER und HOFFMANN, 1978). Der Bedarf an Vitamin D für wachsende Kaninchen beträgt bei adäquater Ca -

und P - Zufuhr (5-8 bzw. 4-6 g / kg) 500 internationale Einheiten Vitamin D pro Kilogramm Alleinfutter (KAMPHUES et al., 1986).

Wegen seiner ausgeprägten Anfälligkeit des Gefäßsystems für Verkalkungen wurde das Kaninchen als Versuchstier zum Studium der Calcinogenität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ ausgewählt. Da Vitamin D_3 und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ bei den Kaninchen qualitativ ähnliche Veränderungen im Gefäß- und Organsystem wie bei anderen Säugern hervorrufen (TVEDEGAARD, 1983), scheint es sich als Versuchstier zum Studium der vergleichenden Calcinogenität verschiedener Vitamin D-Metabolite zu eignen. Durch die Besonderheiten im Calcium - Stoffwechsel kann man jedoch Ergebnisse und Schlußfolgerungen die den Mineralhaushalt betreffen, nicht uneingeschränkt vom Kaninchen auf andere Spezies übertragen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3. MATERIAL UND METHODEN

In Fütterungsversuchen an wachsenden Kaninchen wurde der Einfluß von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ auf Verkalkungen der Gefäße und der inneren Organe makroskopisch und mikroskopisch untersucht. In einem ersten Versuch wurde die zunehmende Verkalkung der Weichteile bei steigenden Konzentrationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dargestellt. In weiteren vier Versuchen wurden die beiden $1,25$ hydroxylierten Metabolite und ihre nur am Kohlenstoffatom C- 1α hydroxylierten Analoge in untereinander vergleichbaren Konzentrationen eingesetzt und ihre unterschiedliche Calcinogenität anhand folgender Parameter verglichen:

- Gewichtsentwicklung
- Serumphosphat
- Serumcalcium
- alkalische Phosphatase im Serum
- absoluter und relativer Knochenaschegehalt des Femurs
- Auftreten von Weichgewebsverkalkungen
 - pathologisch-anatomisch
 - pathologisch-histologisch

3.1 TIERMATERIAL

Als Versuchstiere zur Untersuchung der vergleichenden Calcinogenität der Vitamin D-Metabolite wurden wegen ihrer besonders großen Neigung zu Weichgewebsverkalkungen (LINDT, 1968; KAMPHUES et al., 1986) Kaninchen ausgewählt. Man hoffte, daß Unterschiede in der calcinogenen Wirkung der Vitamin D-Metabolite bei dieser Tierart schon bei geringer Dosierung und kurzer Versuchsdauer in großer Intensität zum Ausdruck kommen. Im ersten Versuch wurden 24 wachsende wildfarbene Kreuzungstiere unterschiedlicher Herkunft (vermittelt durch den

örtlichen Kaninchenzuchtverein) im Alter zwischen 3 und 4 Monaten und einem Gewicht von circa 3 Kilogramm verwendet. Die Tiere waren je zur Hälfte männlich und weiblich. In den folgenden Versuchen wurden, um ein homogenes Tiermaterial zu haben, Rassekaninchen (weiße Neuseeländer) aus einer Versuchstierzucht (Lieferant Dr. Albus, Abtsgmünd) bezogen. Die Tiere waren bei Lieferung zwischen 1.3 und 1.4 Kilogramm schwer, je zur Hälfte männlich und weiblich und etwa 8 Wochen alt. Die "weißen Neuseeländer" sind als Versuchstiere gut geeignet, da sie durch ihr ruhiges Wesen leicht zu handhaben sind. Bei den Albinos sind die Gefäße gut injiziert, wodurch eine Blutentnahme aus der zentralen Ohrarterie leicht möglich ist.

3.2 TIERHALTUNG

Die Kaninchen wurden einzeln in Metallgitterkäfigen (45 cm x 56 cm x 32 cm) mit perforierter Bodenfläche (Lochdurchmesser 15 mm) gehalten. Die Käfigbatterie mit 24 Einzelkäfigen (6 Türme nebeneinander mit je 4 Boxen übereinander) war der Fensterfront entgegengerichtet. Für zusätzliche Beleuchtung sorgte von 6-18 Uhr ein Lichtprogramm. Die Tiere erhielten handelsübliches pelletiertes Alleinfutter für Kaninchen. (Solikanin^R Muskator-Werke Düsseldorf) ad libitum. Der Calciumgehalt dieses Mischfutters betrug 11 g / kg Futter, der Phosphorgehalt 5.5 g / kg Futter, die Vitamin D₃ Konzentration 500 internationale Einheiten / kg. Wasser aus Trinkflaschen mit Nippel stand zur freien Aufnahme zur Verfügung.

3.3 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Nach einer zweiwöchigen Vorperiode, in der sich die Tiere an den neuen Stall gewöhnen sollten, wurden sie in Versuchsgruppen eingeteilt. Die Einteilung erfolgte unter dem Aspekt, möglichst Gruppen mit gleichem Durchschnittsgewicht und annähernd gleichem Geschlechtsverhältnis zu bilden. Extremgewichte wurden aussortiert, deshalb konnten im ersten

Versuch nur vier Gruppen mit je vier Tieren gebildet werden. Der Versuch Nummer 2 bis 4 bestand aus vier Gruppen mit je fünf Kaninchen und einer Kontrollgruppe mit vier Tieren. Im 5. Versuch wurde auf die Kontrollgruppe verzichtet.

Die Hauptperiode betrug in Versuch 1 drei Wochen, in den darauf folgenden Versuchen nur noch zwei Wochen. Während dieser Zeit erhielten die Tiere täglich die zu testenden Metabolite, welche in 1 ml einer Mischung aus Äthanol und Propandiol gelöst waren, oral verabreicht. Die Kontrolltiere bekamen nur das Lösungsmittel. Blutproben aus der Ohrarterie wurden wöchentlich entnommen und die Gewichtsentwicklung überprüft. Bei Versuchsende wurden die Kaninchen in der üblichen Weise geschlachtet wobei nach Tötung durch Genickschlag, der Blutentzug durch Eröffnung der Venae jugulares erfolgte. Die Tiere wurden nun auf Verkalkungen der Weichteile hin untersucht und der Femur zur späteren Veraschung entnommen.

Die Vitamin D- Metabolite wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. W. Meier (Firma Hoffmann - La Roche AG, Basel) zur Verfügung gestellt. Die Substanzen wurden bis zum Versuchsbeginn als kristallines Pulver in dunklen Ampullen bei minus 20 Grad Celsius aufbewahrt. Dann wurden sie in absolutem Äthanol gelöst und mit 1,2 Propandiol, im Verhältnis 1:9, versetzt. Die Metabolite wurden jeweils für den gesamten Versuchszeitraum vorbereitet und bei Kühlschranktemperatur gelagert. 1 ml dieser Metabolitlösungen wurden den Kaninchen pro Tier und Tag oral verabreicht. Dazu wurden die Kaninchen einzeln auf den Schoß genommen, mit dem linken Arm fixiert, das Propandiol-Äthanol-Gemisch in einer 1 ml Plastikspritze aufgezogen und per Knopfkanüle den Tieren direkt in das Maul gespritzt. Die Kaninchen nahmen diese Lösung bereitwillig und vollständig auf.

Eine Zusammenstellung der in den verschiedenen Versuchen verabreichten Metabolite zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Zusammenstellung der in den verschiedenen Versuchen verabreichten Metabolite

	Dosis pro Tier und Tag			
	1,25(OH) ₂ D ₂	1α(OH)D ₂	1,25(OH) ₂ D ₃	1α(OH)D ₃
Versuch 1			0.30 nmol 0.60 nmol 1.20 nmol 4.80 nmol	
Versuch 2	0.60 nmol	0.60 nmol	0.60 nmol	0.60 nmol
Versuch 3	0.30 nmol	1.20 nmol	0.30 nmol	1.20 nmol
Versuch 4	0.45 nmol	0.90 nmol	0.45 nmol	0.90 nmol
Versuch 5	0.45 nmol	1.35 nmol 2.70 nmol	0.45 nmol	1.35 nmol

3.4 PROBENENTNAHME UND BESTIMMUNGSMETHODEN

3.4.1 GEWICHTSENTWICKLUNG

Die Gewichtszunahmen, die sich als geeignete Parameter zur Beurteilung des Allgemeinbefindens und dem Grad der Verkalkung erwiesen, wurden einmal pro Woche geprüft.

3.4.2 SERUMGEWINNUNG UND BESTIMMUNG DER SERUMPARAMETER

Die Blutentnahme erfolgte an der zentralen Ohrarterie. Zu diesem Zweck wurden die Tiere in einer eigens dafür konstruierten Zwangsvorrichtung (Holzkiste 50 cm × 20 cm × 20 cm mit einer runden Öffnung für den Kopf) immobilisiert, das Ohr mit einer Hand fixiert, etwa 3 ml Blut mit einer Einmal-kanüle Nr.1 (0.9 mm × 38 mm) entnommen und in einem Serumröhrchen mit gerinnungsförderndem Granulat aufgefangen. Die Blutproben wurden einmal in der Woche vormittags zwischen 9 und 12 Uhr entnommen. Nach vollständiger Gerinnung (circa 1 Stunde) wurden die Blutproben 10 Minuten lang bei 4000 g pro

Minute zentrifugiert. Mittels Pasteurpipetten wurde das Serum abpipettiert. Zur Bestimmung des Calciumgehaltes und der alkalischen Phosphatase wurde das Serum in Einzelproben durch Tiefgefrieren bei minus 20 Grad konserviert. Zur Serumphosphatbestimmung wurde frisches Serum verwendet.

BESTIMMUNG VON SERUMPHOSPHAT

Die Methode richtete sich nach den Vorschriften der Testkombination "Phosphor" (BOEHRINGER MANNHEIM GmbH). Die Phosphatide wurden dabei zusammen mit dem Serumprotein durch Trichloressigsäure gefällt und der Niederschlag nach Zentrifugation verworfen. Das anorganische Phosphat im Überstand bildet in saurer Lösung mit Ammoniummolybdat und Ammoniumvannadat einen gelbgefärbten Komplex, dessen Farbintensität der Phosphorkonzentration proportional ist und bei 366 nm photometrisch gemessen wird.

BESTIMMUNG VON SERUMCALCIUM

Nach Verdünnung der Proben mit einer fünf prozentigen Lithiumchloridlösung 1:20 mit Hilfe eines Dual Diluters wurde die Serumcalciumbestimmung mit einem Eppendorf Flammenphotometer durchgeführt.

BESTIMMUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum wurde nach den Vorschriften von SIGMA DIAGNOSTICS nach folgendem Prinzip bestimmt: das p-Nitrophenolphosphat wird durch Phosphatasen in Phosphat und p-Nitrophenol gespalten. Die nach einer gewissen Zeit freigesetzte p-Nitrophenolmenge ist proportional der Phosphatase-Aktivität und kann nach Zugabe von Natronlauge aufgrund ihrer gelben Farbe bei 405 nm photometrisch bestimmt werden.

3.4.3 KNOCHENASCHEBESTIMMUNG

Für die Knochenanalytik fand in allen Versuchen der Femur des rechten Hinterlaufes Verwendung. Nach dem Schlachten der Tiere wurde durch Zugang von medial der Femur herauspräpariert, gruppenweise gesammelt und bis zur weiteren Bearbeitung bei minus 20 Grad Celsius konserviert. Nach dem Auftauen und weiteren 30 Minuten Kochzeit konnte der Femur frei von noch vorher anhaftenden Weichteilen, Sehnen und Knorpeln gewonnen werden. Auf Vollständigkeit mußte geachtet werden, da sich bei Jungtieren die Epiphysen noch sehr leicht ablösen. Die Knochen der jeweiligen Versuchsgruppe wurden bis zur Gewichtskonstanz etwa 2 Tage bei 100 Grad Celsius getrocknet und anschließend zur Bestimmung des Femurtrockengewichtes gewogen. Der Aschegehalt wurde nach vollständiger Veraschung der Proben bei 600 Grad Celsius im Muffelofen (etwa 4 Tage) ermittelt. Die Angabe der Knochenasche erfolgte einerseits absolut, andererseits relativ als Aschegehalt des Femur bezogen auf die Knochentrockensubstanz in Prozent (% TS). Damit erhielt man eine Bezugsgröße zum Grad der Mineralisation des Knochens.

3.5 PATHOLOGISCH-ANATOMISCHE UND PATHOLOGISCH-HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

Bei Versuchsende wurden die Tiere getötet und im Institut für Tierpathologie der Universität München (Lehrstuhl für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie, Vorstand Prof. Dr. J. von Sandersleben) seziert und pathologisch-anatomisch beurteilt. Bei der Sektion wurde insbesondere auf Verkalkungen der Weichgewebe geachtet: das Herz im natürlichen Zusammenhang mit der Aorta (Aortenbogen, Aorta thoracica und Aorta abdominalis) wurde eröffnet und auf vorhandene oder Anzeichen beginnender Kalkablagerungen untersucht. Die Nierenoberfläche, nach Entfernung der Capsula fibrosa, sowie die Anschnittflächen der Nieren wurden adspiziert und auf Veränderungen im Bereich des Magen-Darm-Kanals geachtet. Eine Niere, das Herz mit anhaftender Aorta, der rechte

Lungenflügel, Teile des Magens, Colon descendens und ein Halsquerschnitt in Höhe des Kehlkopfes (zur Untersuchung der Arteria carotis) wurden für die histologische Untersuchung entnommen und in zehn prozentigem neutralem Formalin fixiert. Bereits makroskopisch erkennbare Verkalkungen in Teilen der Aorta wurden histologisch nicht mehr untersucht. Von den Gewebeproben wurden wenige Millimeter dicke Scheiben in kleine, mehrfach perforierte Plastikblöcke übergeführt, die Proben im Autotechnikon mit Formol und Xylol entwässert, fixiert, anschließend in Paraffinblöcke gegossen und davon histologische Schnittpräparate angefertigt. Von den aus diesen Blöcken erstellten Gewebeschnitten wurden je zwei mit "Hämatoxylin-Eosin" und je einer nach "von Kossa" gefärbt, wobei die von Kossa-Färbung der selektiven Anfärbung von Verkalkungen dient. Diese Schnittpräparate wurden unter dem Mikroskop ausgewertet und ebenso wie die makroskopischen Befunde nach einem fünfgradigen, subjektiven, halbquantitativen Schema beurteilt, das die Grade der Verkalkung wie folgt einteilt (siehe auch Tabelle 4 und 5) :

- keine Verkalkung feststellbar
- + sehr geringe Verkalkung
- ++ geringe Verkalkung
- +++ mittelgradige Verkalkung
- ++++ starke Verkalkung
- +++++ sehr starke Verkalkung

3.6 STATISTIK

In den Tabellen wurden die Ergebnisse jeweils als Mittelwert ($\bar{x}$) mit der dazugehörigen Standardabweichung (s) dargestellt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des MANN-WHITNEY U-Tests auf ihre Signifikanz geprüft. Dabei wurde $P < 0.05$ als signifikant bezeichnet.

4. VERSUCHSBESCHREIBUNG UND ERGEBNISSE

4.1 CALCINOGENITÄT VON $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (VERSUCH 1)

Versuch 1 stellte einen Vorversuch dar, in dem der Einfluß verschiedener Konzentrationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf Verkalkungen der Weichteile makroskopisch und mikroskopisch untersucht wurde. Da keinerlei Angaben vorlagen welche Mengen des $1,25$ hydroxylierten Metaboliten calcinogen wirken, wurde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in einem sehr weiten Konzentrationsbereich verabreicht.

Versuchsanordnung:

- Gruppe 1 : Kontrolle
- Gruppe 2 : $0.30 \text{ nmol } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$
- Gruppe 3 : $1.20 \text{ nmol } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$
- Gruppe 4 : $4.80 \text{ nmol } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Verabreichungsform : oral

Vorperiode : 14 Tage

Hauptperiode : 21 Tage

Tierzahl pro Gruppe : $n = 4$

Parameter : Gewichtsentwicklung, Serumphosphat, Serumcalcium, Verkalkungsgrad der Weichgewebe (makroskopisch und mikroskopisch)

ERGEBNISSE

Versuchsverlauf:

In der ersten Woche verschlechterte sich das Allgemeinbefinden der Tiere in Gruppe 3 und 4 erheblich. Die Futteraufnahme war reduziert, Bewegungsunlust, Apathie und Polydipsie kamen hinzu. Ein Kaninchen aus Gruppe 4 starb nach vier Tagen an urämischer Gastritis. Aus diesem Grund wurde die Dosis in den Gruppen 3 und 4 reduziert:

Gruppe 3 erhielt nur noch 0.60 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$;

Gruppe 4 erhielt nur noch 1.20 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /Tier und Tag.

Die Kaninchen dieser Gruppen fraßen nun wieder besser.

Gewichtsentwicklung (Abbildung 1)

Die Tiere der Kontrollgruppe erreichten am Ende des Versuchszeitraumes ein deutlich höheres Körpergewicht als die Tiere, denen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in verschiedenen Konzentrationen verabreicht wurde. Während die Kaninchen der Gruppe 2 eine noch relativ gute, diejenigen der Gruppe 3 eine geringe Gewichtszunahme zeigten, nahmen die Tiere der Gruppe 4 ab. Mit steigenden Konzentrationen von Vitamin D-Hormon findet also ein deutlicher Rückgang der Gewichtsentwicklung statt. Gruppe 4 unterschied sich mit $P < 0.025$ statistisch signifikant von der Kontrolle.

Serumphosphat (Tabelle 2)

Nach den ersten vier Tagen waren, den steigenden Konzentrationen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ entsprechend, die Phosphatwerte im Serum bei den einzelnen Gruppen stark erhöht. Bei Versuchsende waren die Serumphosphatspiegel aller mit D-Hormon behandelten Tiere wieder niedriger, lagen aber deutlich über dem Wert der Kontrolltiere. Das an Urämie verendete Kaninchen hatte am Tag des Todes einen Serumphosphatspiegel von 31.7 mg / 100 ml. Gruppe 3 unterschied sich statistisch signifikant von der Kontrolle ($P < 0.05$).

Serumcalcium (Tabelle 3)

Der Serumcalciumgehalt war am Ende des Versuchszeitraumes in den Gruppen 2 und 4 deutlich höher als bei den Kontrolltieren. Diese Gruppen unterschieden sich signifikant von der Kontrolle ($P < 0.05$). Die Serumcalciumkonzentration der

Gruppe 3 war im Vergleich zur Kontrolle nur geringfügig höher.

Untersuchung der Weichgewebe: (vgl. Abb. 2 und 3)

1. Pathologisch-anatomische Befunde (Tabelle 4)

Zwei Tiere der Kontrollgruppe wiesen jeweils einen stecknadelkopfgroßen Kalkherd im Aortenbogen auf. Es handelte sich dabei um Spontanverkalkungen, welche bei Kaninchen häufiger auftreten.

Bei der Sektion der Tiere die $0.30 \text{ nmol } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pro Tag erhielten, waren makroskopisch keine Veränderungen erkennbar.

0.60 nmol bzw. $1.20 \text{ nmol } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führten bei den Kaninchen zu deutlichen Verhärtungen der Aorta, welche sich nach deren Eröffnung als dicke, über die gesamte Länge der Aorta verteilte, platten- oder wabenförmige Kalkinkrustierungen herausstellten (siehe Abbildung 2). Die Intensität der Verkalkung im Bereich der Aorta abdominalis war bei den Tieren der Gruppe 4 stärker ausgeprägt.

Die Nieren aller Tiere die bereits grobsinnlich feststellbare Gefäßwandverkalkungen aufwiesen, zeigten an ihrer Oberfläche feine, diffus verteilte, weiße Stippchen. An der Schnittfläche der Nieren sah man radiär angeordnete weiße Streifen am Übergang der Rindenzone in die Markzone (siehe Abbildung 3).

Drei Kaninchen der Gruppe 4 wiesen am Magenfundus weiße, zum Teil konfluierende Herde unter der Serosa auf.

2. Pathologisch-histologische Befunde (Tabelle 5)

Bei allen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ behandelten Tieren zeigte sich das Bild einer Nephrocalcinose. Die Verkalkungen traten im Bereich der tubulären Basalmembran, der Bowmanschen Kapsel, im Interstitium und in der Lamina elastica interna der Nierenarterien auf. Eiweißkalkzylinder in den distalen Tubuli führten zu einer mechanischen Schädigung der Tubulusepithel-

lien.

Die makroskopisch sichtbaren Veränderungen am Magen erwiesen sich als primäre Verkalkungen in den Basalmembranen der Magendrüsen und zum Teil auch in den elastischen Membranen der submucösen Arterien. Bei drei Kaninchen der Gruppe 4 kam es zu Kalkablagerungen an den Basalmembranen der Bronchialepithelien. In dieser Gruppe fand sich ebenfalls ein Tier mit einer Fibrosierung und Verkalkung des linken Vorkammerepithels sowie Verkalkungen am Klappenansatz. Bei einem weiteren mit 1.20 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ behandelten Kaninchen waren Coronargefäße verkalkt, bei zwei anderen die Lamina elastica interna der Arteria carotis. Die Kontrolltiere waren frei von solchen Veränderungen.

Abbildung 1: Gewichtsentwicklung

Durchschnittliches Körpergewicht der
Versuchstiere pro Gruppe
(Versuch 1 ; n = 4)
(*) signifikant mit $P < 0.025$.

- Kontrolle
- △ 0.3 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$
- 1.2 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ab 8. Tag 0.6 nmol
- ▲ 4.8 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ab 8. Tag 1.2 nmol (*)

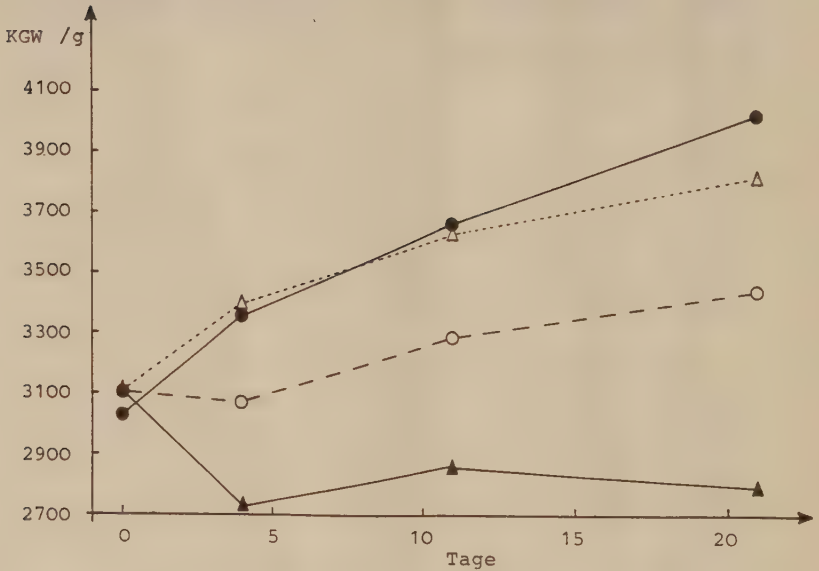


Tabelle 2: Serumphosphatgehalt

(Versuch 1 ; n = 4)

(*) statistisch signifikant (P < 0.05)

Gr.	Gabe pro Tier u. Tag	Serumphosphatgehalt mg / 100 ml			
		Tag 0 $\bar{x} \pm s$	Tag 4 $\bar{x} \pm s$	Tag 11 $\bar{x} \pm s$	Tag 21 $\bar{x} \pm s$
1	Kontrolle	4.8 $\pm$ 0.7	5.7 $\pm$ 0.4	6.5 $\pm$ 0.1	6.1 $\pm$ 1.3
2	0.3 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	4.9 $\pm$ 0.2	6.5 $\pm$ 0.9	5.7 $\pm$ 0.5	6.8 $\pm$ 1.1
3	1.2 nmol ab 8. Tag 0.6 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	5.3 $\pm$ 0.5	8.9 $\pm$ 0.5	8.6 $\pm$ 1.0	7.6 $\pm$ 0.4 (*)
4	4.8 nmol ab 8. Tag 1.2 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	4.0 $\pm$ 0.6	12.8 $\pm$ 12	9.3 $\pm$ 0.2	7.3 $\pm$ 0.9

Tabelle 3: Serumcalciumgehalt

(Versuch 1 ; n = 4)

(*) statistisch signifikant (P < 0.05)

Gr.	Gabe pro Tier u. Tag	Serumcalciumgehalt mg / 100 ml			
		Tag 0 $\bar{x} \pm s$	Tag 4 $\bar{x} \pm s$	Tag 11 $\bar{x} \pm s$	Tag 21 $\bar{x} \pm s$
1	Kontrolle	16.9 $\pm$ 0.7	14.1 $\pm$ 0.7	13.8 $\pm$ 0.3	13.6 $\pm$ 0.7
2	0.3 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	16.6 $\pm$ 1.4	13.7 $\pm$ 0.5	14.4 $\pm$ 0.5	15.3 $\pm$ 0.7 (*)
3	1.2 nmol ab 8. Tag 0.6 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	16.1 $\pm$ 1.3	13.8 $\pm$ 0.7	14.6 $\pm$ 0.3	14.1 $\pm$ 0.6
4	4.8 nmol ab 8. Tag 1.2 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	16.6 $\pm$ 1.6	13.1 $\pm$ 1.8	14.1 $\pm$ 1.1	15.7 $\pm$ 0.1 (*)

Abbildung 2: Makroskopisch sichtbare plattenförmige Kalk-
inkrustierungen in der Aorta thoracica



Abbildung 3: Makroskopisches Bild einer Nephrocalcinose

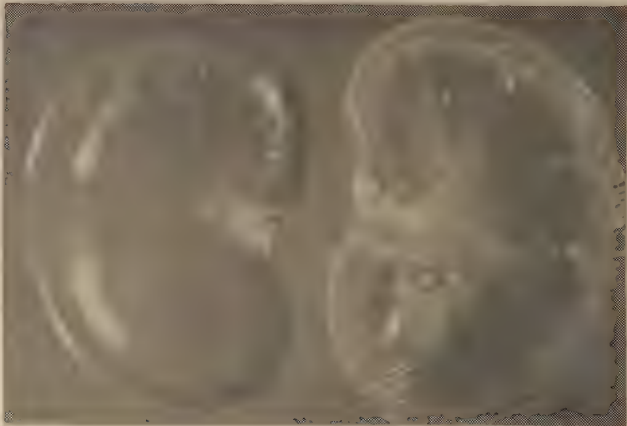


Tabelle 4: Verkalkungsgrad der Aorta (makroskopisch)

(Versuch 1 ; Versuchsdauer 3 Wochen ; n = 4)
(1) am 4. Versuchstag an Urämie gestorben

- keine Verkalkung feststellbar
+ sehr geringe Verkalkung
++ geringe Verkalkung
+++ mittelgradige Verkalkung
++++ starke Verkalkung
+++++ sehr starke Verkalkung

Gabe pro Tier u. Tag		untersuchtes Organ		
		Aortenwurzel	Aorta thorac.	Aorta abdom.
Kontrolle	1a	-	-	-
	1b	-	-	-
	1c	+	-	-
	1d	+	-	-
	1e	-	-	-
0.3 nmol 1.25(OH) ₂ D ₃	2a	-	-	-
	2b	-	-	-
	2c	-	-	-
	2d	-	-	-
1.2 nmol 1.25(OH) ₂ D ₃ ab 8. Tag 0.6 nmol	3a	+	+	+
	3b	+	+	+
	3c	+	-	-
	3d	+	+	+
4.8 nmol 1.25(OH) ₂ D ₃ ab 8. Tag 1.2 nmol	4a	+	+	+
	4b	+	+	+
	4c	+	-	-
	4d	+	+	+

(1)

4.2 VERGLEICHENDE CALCINOGENITÄT VON $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (A) UND $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ (B). A:B = 1:1 (VERSUCH 2)

Ein eindeutiger Wirkungsvergleich der Calcinogenität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ war mit einem so heterogenen Tiermaterial wie es im Vorversuch verwendet wurde, nicht möglich. Deshalb wurden in den nun folgenden Versuchen ausschließlich Kaninchen der Rasse "weiße Neuseeländer" verwendet. Diese Kaninchen wurden mit einem Gewicht zwischen 1.3 und 1.5 kg geliefert und waren, da sie aus einer Versuchszuchtanstalt stammten, bereits an Käfighaltung, Trinkflaschen und Pellets gewöhnt. Dadurch reduzierte sich die Vorperiode auf zehn Tage.

In Versuch 1 hatte sich gezeigt, daß die Tiere schon bei der mittleren Dosierung von 0.60 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pro Tier und Tag stark verkalkten. Da die nun verwendeten weißen Neuseeländer ein viel geringeres Ausgangsgewicht hatten, die Menge von 0.60 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ pro Tier und Tag aber gleich bleiben sollte, wurde die Dauer der Versuche auf zwei Wochen reduziert. Im zweiten Versuch wurden die beiden Vitamin D-Metabolite und ihre, nur am Kohlenstoffatom C-1 hydroxylierten Analoge in der mittleren Dosierung des Vorversuches in äquimolaren Mengen eingesetzt.

Versuchsanordnung:

- Gruppe 1 : Kontrolle
- Gruppe 2 : 0.60 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$
- Gruppe 3 : 0.60 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$
- Gruppe 4 : 0.60 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$
- Gruppe 5 : 0.60 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$

Verabreichungsform : oral
Vorperiode : 10 Tage
Hauptperiode : 14 Tage
Tierzahl pro Gruppe : n = 5

Parameter : Gewichtsentwicklung, Serumphosphat, Serumcalcium, alkalische Phosphatase im Serum, absoluter und relativer Knochenaschegehalt, Verkalkungsgrad der Weichgewebe (makroskopisch und mikroskopisch)

ERGEBNISSE

Versuchsverlauf:

Je ein Tier aus den Gruppen 2 und 3 starben an einer urämischen Gastritis und Enterocolitis. Die klinischen Symptome waren neben Anorexie und Polydipsie, Apathie, steife Bewegungen und Kotabsatz mit klaren schleimigen Beimengungen.

Gewichtsentwicklung (Abbildung 4)

Bereits innerhalb der ersten acht Versuchstage nahmen die mit den zweifach hydroxylierten Metaboliten behandelten Tiere ab. Am Ende des Versuchszeitraumes unterschieden sich diese beiden Gruppen mit $p < 0.025$ statistisch signifikant von den Kontrolltieren. Die mit der äquimolaren Menge an $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ behandelten Kaninchen zeigten ein etwas geringeres Wachstum als die Kontrollen.

Serumphosphat (Tabelle 6)

Die Phosphatkonzentrationen im Serum lagen bei den mit Vitamin D-Metaboliten behandelten Tieren deutlich über den der unbehandelten Kontrolle. Die Gruppen 2 bis 5 unterschieden sich alle mit $P < 0.05$ statistisch signifikant von der Kontrolle. Die höchsten Phosphatkonzentrationen wiesen dabei die Gruppen auf, denen $1,25$ hydroxylierte Metabolite verabreicht wurden. Die Phosphatwerte derjenigen Kaninchen, die die nur am Kohlenstoffatom C-1 hydroxylierten Analoge erhielten, lagen zwischen den Werten der mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ behan-

delten und den Kontrolltieren.

Serumcalcium (Tabelle 7)

Die Calciumkonzentration im Serum veränderte sich während der Versuchsdauer bei allen Gruppen nur geringfügig. Eine Signifikanz war bei keiner Gruppe nachweisbar.

Alkalische Phosphatase im Serum (Tabelle 8)

Während sich die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum bei den Gruppen 4 und 5 sowie der Kontrolle kaum veränderte, nahm sie bei den mit 1,25 hydroxylierten Metaboliten behandelten Tieren ab.

Absoluter und relativer Knochenaschegehalt (Tabelle 9)

Die eingesetzten Metabolite führten zu keinen Veränderungen des absoluten Knochenaschegehaltes. Lediglich bei den mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ behandelten Kaninchen war der mittlere Aschegehalt des Femur etwas geringer. Der relative Knochenaschegehalt dieser Gruppe entsprach dem der Kontrolle. Die mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ behandelten Tiere der Gruppe 3 zeigten einen Anstieg des relativen Aschegehaltes. Bei den Tieren die C-1 α hydroxylierte Metabolite erhielten, war der Gehalt der relativen Knochenasche im Vergleich zur Kontrolle geringer.

Untersuchung der Weichgewebe:

1. Pathologisch-anatomische Befunde (Tabelle 10)

0.60 nmol der 1,25 hydroxylierten Metabolite führten bei den Kaninchen zu starken knopf- und plattenförmige Kalkinkrustierungen im Bereich der gesamten Aorta. Vergleicht man den Grad der Verkalkung im Bereich der Aorta thoracica und Aorta

abdominalis beider Gruppen, so waren die Veränderungen bei den mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ behandelten Tieren geringfügig stärker. Ein Tier dieser Gruppe zeigte lediglich geringe Kalkablagerungen im Aortenbogen, während ein mit dem entsprechenden Vitamin D_2 -Metaboliten behandeltes Kaninchen im Bereich der gesamten Aorta sehr stark verkalkt war.

Die Nieren der Kaninchen die $1,25$ hydroxylierte Metabolite erhielten, waren an ihrer Oberfläche mit feinen weißen Stippchen übersät, an der Schnittfläche zeigte sich am Übergang der Rinden- in die Markschicht ein weißer Randsaum. An Magen und Darm waren bei diesen Tieren konfluierende weiße Herde unter der Serosa sichtbar.

Die Kaninchen der Gruppen 4 und 5 waren ebenso wie die Kontrolltiere frei von solchen calcinotischen Veränderungen.

2. Pathologisch-histologische Befunde (Tabelle 11)

Bei der histologischen Untersuchung der schon makroskopisch veränderten Nieren wurden starke Kalkablagerungen in den Tubulusepithelien und Kalkzylinder in den gewundenen Harnkanälchen der Nierenrinde und Mark festgestellt. Zum Teil kamen auch Verkalkungen in der Media und Lamina elastica interna der Nierenarterien vor.

Bei 3 mit $0.60 \text{ nmol } 1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ behandelten Kaninchen waren geringe Mengen lumenfüllender Kalkzylinder, bei 2 Tieren denen die äquimolaren Mengen $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ verabreicht wurden, nur sehr vereinzelt Kalkpräzipitate in der Niere vorhanden.

Mit Hilfe der "von Kossa" Färbung konnte gezeigt werden, daß es sich bei den weißen Herden unter der Serosa von Magen und Darm der mit $1,25$ hydroxylierten Metaboliten behandelten Kaninchen, tatsächlich um Kalkpräzipitate handelte. Jeweils vier Tiere dieser beiden Gruppen wiesen Kalkablagerungen an den Basalmembranen der Bronchialepithelien auf. Verkalkungen des Herzvorkammerepithels kamen bei drei Tieren der Gruppe 2 und einem Kaninchen aus Gruppe 3 vor. Verkalkungen der Lamina elastica interna der Arteria carotis wurden bei zwei Tieren der Gruppe 2 gefunden.

Die Kaninchen der Kontrollgruppe waren auch mikroskopisch frei von calcinotischen Veränderungen.

Abbildung 4: Gewichtsentwicklung

Durchschnittliches Körpergewicht der
Versuchstiere pro Gruppe
(Versuch 2 ; n = 5)
(*) signifikant mit $P < 0.025$.

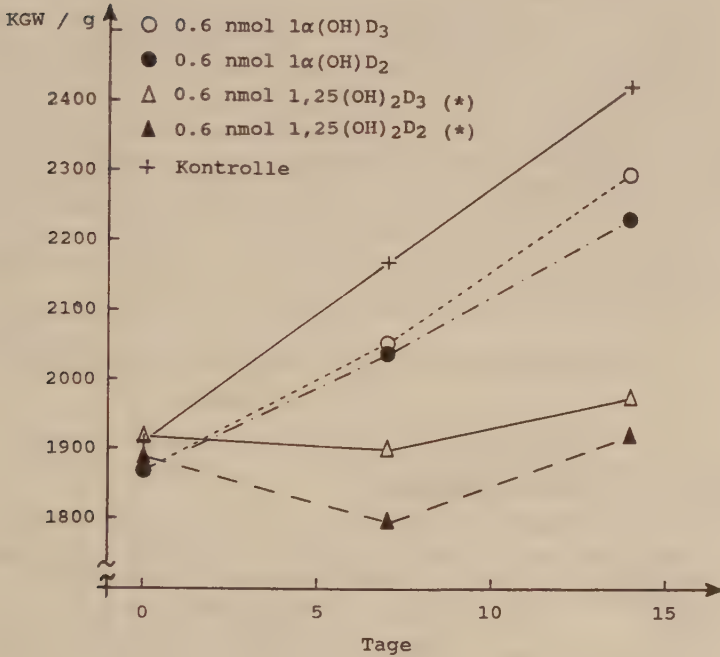


Tabelle 6: Serumphosphatgehalt

(Versuch 2 ; n = 5)

(*) statistisch signifikant (P < 0.05)

Gr.	Gabe pro Tier u. Tag	Serumphosphatgehalt in mg / 100 ml		
		Tag 0 $\bar{x} \pm s$	Tag 7 $\bar{x} \pm s$	Tag 14 $\bar{x} \pm s$
1	Kontrolle	6.7 $\pm$ 1.0	5.7 $\pm$ 0.8	3.0 $\pm$ 0.4
2	0.6 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	6.3 $\pm$ 1.3	7.4 $\pm$ 0.6	6.1 $\pm$ 1.3 (*)
3	0.6 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	5.7 $\pm$ 0.4	6.5 $\pm$ 0.8	6.0 $\pm$ 0.8 (*)
4	0.6 nmol 1 α (OH)D ₃	6.0 $\pm$ 1.2	6.4 $\pm$ 0.3	4.8 $\pm$ 0.5 (*)
5	0.6 nmol 1 α (OH)D ₂	5.7 $\pm$ 0.6	5.9 $\pm$ 0.4	5.0 $\pm$ 1.4 (*)

Tabelle 7: Serumcalciumgehalt

(Versuch 2 ; n = 5)

Gr.	Gabe pro Tier u. Tag	Serumcalciumgehalt mg / 100 ml		
		Tag 0 $\bar{x} \pm s$	Tag 7 $\bar{x} \pm s$	Tag 14 $\bar{x} \pm s$
1	Kontrolle	14.2 $\pm$ 0.7	14.3 $\pm$ 0.3	14.4 $\pm$ 1.1
2	0.6 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	14.6 $\pm$ 0.7	13.6 $\pm$ 1.5	15.3 $\pm$ 0.9
3	0.6 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	13.4 $\pm$ 0.6	14.1 $\pm$ 1.5	13.9 $\pm$ 0.8
4	0.6 nmol 1 α (OH)D ₃	13.8 $\pm$ 1.8	14.5 $\pm$ 1.5	14.4 $\pm$ 0.8
5	0.6 nmol 1 α (OH)D ₂	14.1 $\pm$ 0.9	15.1 $\pm$ 0.4	14.8 $\pm$ 0.4

Tabelle 8: Alkalische Phosphatase im Serum

VB = Versuchsbeginn, VE = Versuchsende
(Versuch 2; n = 5)

Gruppe	Gabe pro Tier u. Tag	alkalische Phosphatase units/l	
		VB $\bar{x} \pm s$	VE $\bar{x} \pm s$
1	Kontrolle	126 $\pm$ 25	111 $\pm$ 42
2	0.60 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	104 $\pm$ 13	84 $\pm$ 29
3	0.60 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	114 $\pm$ 19	79 $\pm$ 21
4	0.60 nmol 1 α (OH)D ₃	109 $\pm$ 20	115 $\pm$ 13
5	0.60 nmol 1 α (OH)D ₂	116 $\pm$ 12	100 $\pm$ 7

Tabelle 9: Absoluter und relativer Knochenaschegehalt

(Versuch 2 ; n = 5)

Gruppe	Gabe pro Tier u. Tag	Knochenaschegehalt	
		in g $\bar{x}$	in % TS $\bar{x}$
1	Kontrolle	3.0	54.6
2	0.60 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	2.8	55.2
3	0.60 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	3.0	59.8
4	0.60 nmol 1 α (OH)D ₃	3.0	51.8
5	0.60 nmol 1 α (OH)D ₂	3.0	51.7

Tabelle 10: Verkalkungsgrad der Aorta (makroskopisch)
 (Versuch 2 ; Versuchsdauer 14 Tage ; n = 5)
 (1) am 6. Versuchstag an Urämie gestorben
 (2) am 5. Versuchstag an Urämie gestorben
 Zeichenerklärung siehe Tabelle 4, Seite 39

Gabe pro Tier u. Tag		untersuchtes Organ		
		Aortenwurzel	Aorta thorac.	Aorta abdom.
Kontrolle	1a	-	-	-
	1b	-	-	-
	1c	-	-	-
	1d	-	-	-
0.6 nmol 1.25(OH) ₂ D ₃	2a	+	-	-
	2b	+	+	+
	2c	+	+	+
	2d	+	+	+
	2e	+	+	-
0.6 nmol 1.25(OH) ₂ D ₂	3a	+	+	-
	3b	+	+	-
	3c	+	+	+
	3d	+	+	+
	3e	+	+	+
0.6 nmol 1 α (OH)D ₃	4a	-	-	-
	4b	-	-	-
	4c	-	-	-
	4d	-	-	-
	4e	-	-	-
0.6 nmol 1 α (OH)D ₂	5a	-	-	-
	5b	-	-	-
	5c	-	-	-
	5d	-	-	-
	5e	-	-	-

Tabelle 11: Verkalkungsgrad der Weichgewebe (mikroskopisch)
(Versuch 2 ; Versuchsdauer 14 Tage ; n = 5)
Zeichenerklärung siehe Tabelle 5, Seite 40

Gabe pro Tier u. Tag	Herzvor- kammer	Aorten- wurzel	untersuchtes		Organ Niere	Lunge	Arteria carotis	Magen- Darm
			Aorta thorac.	Aorta abdom.				
Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-
1a	-	-	-	-	-	-	-	-
1b	-	-	-	-	-	-	-	-
1c	-	-	-	-	-	-	-	-
1d	-	-	-	-	-	-	-	-
2a	-	m	-	-	+	-	-	+
2b	+	m	m	m	+	+	+	+
2c	+	m	m	m	+	+	+	+
2d	+	m	m	m	+	+	+	+
2e	-	m	m	m	+	+	+	+
3a	-	m	m	+	+	+	-	+
3b	-	m	m	+	+	+	-	+
3c	-	m	m	m	+	+	-	+
3d	+	m	m	m	+	+	-	+
3e	-	m	m	m	+	+	-	+
4a	-	-	-	-	+	-	-	-
4b	-	-	-	-	+	-	-	-
4c	-	-	-	-	-	-	-	-
4d	-	-	-	-	-	-	-	-
4e	-	-	-	-	+	-	-	-
5a	-	-	-	-	+	-	-	-
5b	-	-	-	-	+	-	-	-
5c	-	-	-	-	-	-	-	-
5d	-	-	-	-	-	-	-	-
5e	-	-	-	-	+	-	-	-

4.3 VERGLEICHENDE CALCINOGENITÄT VON $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (A) UND $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ (B). A:B = 1:4 (VERSUCH 3)

In den vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, daß sich $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in hohen Dosen bezüglich ihrer calcinogenen Aktivität ähnlich verhalten. Um den Bereich zu ermitteln, in dem die Verkalkungen gerade einsetzen, wurden die Dosierungen dieser beiden Substanzen aus dem vorangegangenen Versuch auf die Hälfte reduziert.

Da 0.60 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ bzw. die äquimolare Menge $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ lediglich mikroskopisch erkennbare geringfügige Verkalkungen der Nieren verursacht hatten, wurden ihre Dosierungen nun verdoppelt. Daraus ergab sich ein Verhältnis von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zu $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ wie 1:4.

Versuchsanordnung :

- Gruppe 1 : Kontrolle
- Gruppe 2 : 0.30 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$
- Gruppe 3 : 0.30 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$
- Gruppe 4 : 1.20 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$
- Gruppe 5 : 1.20 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$

Verabreichungsform : oral

Vorperiode : 10 Tage

Hauptperiode : 14 Tage

Tierzahl pro Gruppe : n = 5

Parameter : Gewichtsentwicklung, Serumphosphat, Serumcalcium, alkalische Phosphatase im Serum, absoluter und relativer Knochenaschegehalt, Verkalkungsgrad der Weichgewebe (makroskopisch und mikroskopisch)

ERGEBNISSE

Gewichtsentwicklung (Abbildung 5)

Die Zunahmen in den Gruppen 2, 3 und 5 waren jeweils gleich,

lagen aber deutlich unter den Zuwachsraten der Kontrollen. Die geringste Gewichtsentwicklung zeigten die mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ behandelten Kaninchen. Sie unterschieden sich statistisch signifikant von den Kontrolltieren ($P < 0.025$).

Serumphosphat (Tabelle 12)

Während in den ersten acht Tagen die Serumphosphatkonzentration der Kontrollgruppe konstant blieb, stieg sie bei allen mit Vitamin D-Metaboliten behandelten Gruppen an. Am Ende der Versuchsperiode sanken bei allen Tieren die Phosphatkonzentrationen im Serum unter den Ausgangswert ab. Eine Ausnahme bildeten die mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ behandelten Kaninchen. Bei ihnen war die Phosphatkonzentration im Serum geringfügig höher als am Tag 0. Sie unterschieden sich mit $P < 0.05$ signifikant von den Kontrolltieren.

Serumcalcium (Tabelle 13)

Der Serumcalciumspiegel blieb bei den beiden mit 1,25 hydroxylierten Metaboliten behandelten Gruppen 2 und 3 konstant. Bei der Kontrolle und Gruppe 5 war ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Der Serumcalciumgehalt der mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ behandelten Tiere sank.

Alkalische Phosphatase im Serum (Tabelle 14)

Die Aktivität der alkalische Phosphatase im Serum verringerte sich bei den Gruppen 1, 2, 3 und 5 gleichmäßig. Bei den mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ behandelten Kaninchen war die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum deutlich reduziert. Die Gruppe 4 unterschied sich statistisch signifikant von der Kontrolle ($P < 0.05$).

Absoluter und relativer Knochenaschegehalt (Tabelle 15)

Der absolute Knochenaschegehalt unterschied sich bei den einzelnen Gruppen nicht. Der Gehalt der relativen Knochenasche war bei den mit 1.20 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ behandelten Kaninchen am höchsten.

Untersuchung der Weichgewebe:

1. Pathologisch-anatomische Befunde (Tabelle 16)

Mit Ausnahme der mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ behandelten Kaninchen traten Verkalkungen im Gefäßsystem bei allen anderen, mit Vitamin D-Metaboliten behandelten Tieren, nur im Aortenbogen auf. Ein Tier der Kontrollgruppe wies Spontanverkalkungen in der Aortenwurzel auf. Nur bei einem Kaninchen, das 0.3 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ erhalten hatte, war der Grad der Verkalkung etwas stärker als bei diesem Kontrolltier. Bei allen anderen Kaninchen die $1,25$ hydroxylierte Metabolite bzw. $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ verabreicht bekamen, war der Verkalkungsgrad entweder entsprechend oder geringer. An der Nierenoberfläche und im Anschnitt sah man bei diesen Tieren nur vereinzelt weiße Stippchen.

Vier der fünf mit 1α -Hydroxyvitamin D_3 behandelten Tiere wiesen mittlere bis starke Verkalkungen im Aortenbogen und in der Aorta thoracica auf. Nur bei zwei von ihnen waren auch in der Aorta abdominalis sehr geringe Kalkablagerungen erkennbar. Die Nieren aller zu dieser Gruppe gehörenden Kaninchen, waren hochgradig verändert.

2. Pathologisch-histologische Befunde (Tabelle 17)

Bei den schon grobsinnlich stark veränderten Nieren der mit 1α -Hydroxyvitamin D_3 behandelten Tiere wurde mikroskopisch eine starke Nierencalcinose festgestellt. Zwei Kaninchen dieser Gruppe wiesen auch Verkalkungen der Bronchialepithelien auf, bei einem dieser Tiere traten noch an den Basalmembranen von Magen und Darm Verkalkungen auf.

Die Gabe von 1.2 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ führte ebenfalls zu stärkeren Kalkablagerungen in den Tubulusepithelien und zur Bildung von Kalkzylindern in den gewundenen Harnkanälchen der Nierenrinde.

Jeweils vier der mit 1,25 hydroxylierten Metaboliten behandelten Kaninchen zeigten leichte Verkalkungen der Nieren, deren Grad bei beiden Gruppen entsprechend war.

Die Kontrolltiere waren frei von solchen Veränderungen.

Abbildung 5: Gewichtsentwicklung

Durchschnittliches Körpergewicht der
Versuchstiere pro Gruppe
(Versuch 3 ; n = 5)
(*) signifikant mit $P < 0.05$.

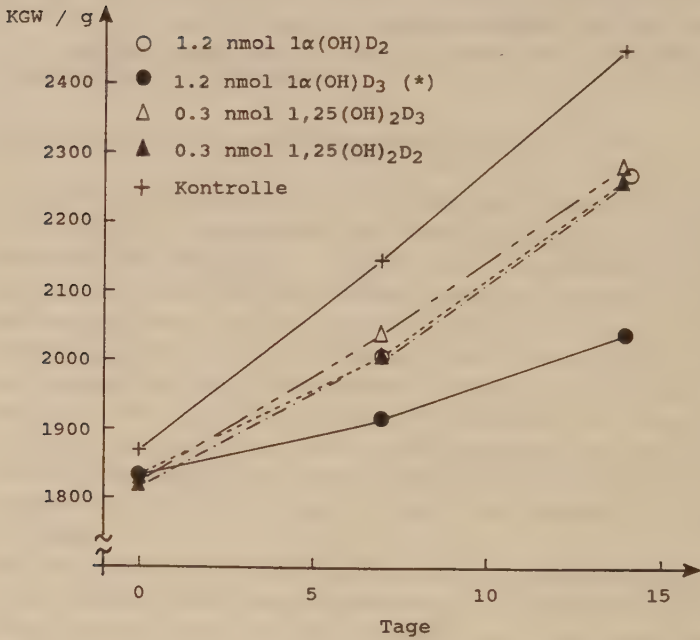


Tabelle 12: Serumphosphatgehalt

(Versuch 3 ; n = 5)

(*) statistisch signifikant (P < 0.05)

Gr.	Gabe pro Tier u. Tag	Serumphosphatgehalt in mg / 100 ml		
		Tag 0 $\bar{x} \pm s$	Tag 7 $\bar{x} \pm s$	Tag 14 $\bar{x} \pm s$
1	Kontrolle	6.0 $\pm$ 1.2	6.1 $\pm$ 0.7	5.1 $\pm$ 0.6
2	0.3 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	6.0 $\pm$ 0.8	6.6 $\pm$ 0.8	5.7 $\pm$ 0.6
3	0.3 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	5.5 $\pm$ 1.3	6.6 $\pm$ 0.7	5.1 $\pm$ 0.7
4	1.2 nmol 1 α (OH)D ₃	5.8 $\pm$ 0.6	7.3 $\pm$ 0.6	6.1 $\pm$ 0.5 (*)
5	1.2 nmol 1 α (OH)D ₂	5.5 $\pm$ 0.4	7.1 $\pm$ 0.5	4.8 $\pm$ 1.0

Tabelle 13: Serumcalciumgehalt

(Versuch 3 ; n = 5)

Gr.	Gabe pro Tier u. Tag	Serumcalciumgehalt mg / 100 ml		
		Tag 0 $\bar{x} \pm s$	Tag 7 $\bar{x} \pm s$	Tag 14 $\bar{x} \pm s$
1	Kontrolle	13.5 $\pm$ 1.8	13.6 $\pm$ 0.3	14.5 $\pm$ 0.6
2	0.3 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	15.2 $\pm$ 1.2	15.3 $\pm$ 2.0	15.1 $\pm$ 0.6
3	0.3 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	15.5 $\pm$ 0.6	14.7 $\pm$ 1.5	15.1 $\pm$ 0.8
4	1.2 nmol 1 α (OH)D ₃	14.9 $\pm$ 1.2	14.8 $\pm$ 1.2	13.8 $\pm$ 1.3
5	1.2 nmol 1 α (OH)D ₂	14.6 $\pm$ 0.9	15.4 $\pm$ 0.8	15.6 $\pm$ 1.1

Tabelle 14: Alkalische Phosphatase im Serum

VB = Versuchsbeginn, VE = Versuchsende
(Versuch 3 ; n = 5)

* statistisch signifikant (P < 0.05)

Gruppe	Gabe pro Tier u. Tag	alkalische Phosphatase units/l	
		VB $\bar{x} \pm s$	VE $\bar{x} \pm s$
1	Kontrolle	116 $\pm$ 23	83 $\pm$ 21
2	0.30 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	102 $\pm$ 21	80 $\pm$ 16
3	0.30 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	99 $\pm$ 27	75 $\pm$ 24
4	1.20 nmol 1 α (OH)D ₃	101 $\pm$ 24	56 $\pm$ 11 *
5	1.20 nmol 1 α (OH)D ₂	102 $\pm$ 18	77 $\pm$ 13

Tabelle 15: Absoluter und relativer Knochenaschegehalt

(Versuch 3 ; n = 5)

Gruppe	Gabe pro Tier u. Tag	Knochenaschegehalt	
		in g $\bar{x}$	in % TS $\bar{x}$
1	Kontrolle	2.9	52.3
2	0.30 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	2.9	51.9
3	0.30 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	3.1	53.2
4	1.20 nmol 1 α (OH)D ₃	3.1	55.6
5	1.20 nmol 1 α (OH)D ₂	2.9	52.9

Tabelle 16: Verkalkungsgrad der Aorta (makroskopisch)
(Versuch 3 ; Versuchsdauer 14 Tage ; n = 5)
Zeichenerklärung siehe Tabelle 4, Seite 39

Gabe pro Tier u. Tag		untersuchtes Organ		
		Aortenwurzel	Aorta thorac.	Aorta abdom.
Kontrolle	1a	+ +	-	-
	1b	-	-	-
	1c	-	-	-
	1d	-	-	-
0.3 nmol 1.25(OH) ₂ D ₃	2a	-	-	-
	2b	+ +	-	-
	2c	-	-	-
	2d	+	-	-
	2e	-	-	-
0.3 nmol 1.25(OH) ₂ D ₂	3a	+	-	-
	3b	-	-	-
	3c	-	-	-
	3d	+	-	-
	3e	+ + +	-	-
1.2 nmol 1 α (OH)D ₃	4a	+	+ +	-
	4b	+ + +	+ + + +	+
	4c	+	-	-
	4d	+ + + +	+ + + +	+
	4e	+ + +	+ +	-
1.2 nmol 1 α (OH)D ₂	5a	+	-	-
	5b	-	-	-
	5c	-	-	-
	5d	+	-	-
	5e	+	-	-

Tabelle 17: Verkalkungsgrad der Weichgewebe (mikroskopisch)
(Versuch 3 ; Versuchsdauer 14 Tage ; n = 5)
Zeichenerklärung siehe Tabelle 5, Seite 40

Gabe pro Tier u. Tag	Herzvor- kammer	Aorten- wurzel	untersuchtes Organ			Lunge	Arteria carotis	Magen- Darm
			Aorta thorac.	Aorta abdom.	Niere			
Kontrolle	-	m	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
0.3 nmol 1.25(OH) ₂ D ₃	-	-	-	-	+	-	-	-
	-	m	-	-	+	-	-	-
	-	-	-	-	+	-	-	-
	-	m	-	-	+	-	-	-
	-	-	-	-	+	-	-	-
0.3 nmol 1.25(OH) ₂ D ₂	-	m	-	-	-	-	-	o
	-	-	-	-	+	-	-	o
	-	-	-	-	+	-	-	o
	-	m	-	-	+	-	-	o
	-	m	-	-	+	-	-	-
1.2 nmol 1α(OH)D ₃	-	m	m	-	+	-	o	-
	-	m	m	m	+	+	-	-
	-	m	m	m	+	+	-	-
	-	m	m	m	+	+	-	+
	-	m	m	m	+	+	-	-
1.2 nmol 1α(OH)D ₂	-	m	-	-	+	-	-	-
	-	-	-	-	+	-	-	-
	-	-	-	-	+	-	-	-
	-	m	-	-	+	-	-	-
	-	m	-	-	+	-	-	-

4.4 VERGLEICHENDE CALCINOGENITÄT VON $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (A) UND $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ (B). A:B = 1.5:3 (VERSUCH 4)

Wie es sich aus den letzten beiden Versuchen ergab, setzte nach Gabe von 0.3 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ die verkalkende Wirkung erst ein, während mit der doppelten Dosis bereits eine sehr hohe Calcinogenität erreicht wurde. Vergleicht man die calcinogene Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, so ist diese bei den untersuchten Dosierungen ähnlich. Die Frage ob sich bei einer mittleren Dosierung von 0.45 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zwischen den beiden Metaboliten Unterschiede in ihrer calcinogenen Wirkung ergeben, sollte in dem nun folgenden Versuch geklärt werden.

Die lediglich am Kohlenstoffatom C-1 hydroxylierten Analoge führten bei den in Versuch 2 getesteten Dosierungen zu nur mikroskopisch feststellbaren vereinzelt Nierenverkalkungen. Nach Gabe der doppelten Dosis wurde ein Wirkungsunterschied zwischen den beiden C-1 α hydroxylierten Metaboliten deutlich. 1.20 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ pro Tier und Tag wirkten stärker calcinogen als die äquimolare Menge $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$. Wie sich diese beiden Substanzen bei einer mittleren der schon untersuchten Dosierungen untereinander verhalten, sollte nun geprüft werden.

Das Verhältnis von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zu $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ betrug in diesem vierten Versuch 1.5 zu 3.

Versuchsanordnung:

- Gruppe 1 : Kontrolle
- Gruppe 2 : 0.45 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$
- Gruppe 3 : 0.45 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$
- Gruppe 4 : 0.90 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$
- Gruppe 5 : 0.90 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$

Verabreichungsform : oral

Vorperiode : 5 Tage

Hauptperiode : 14 Tage

Tierzahl pro Gruppe : n = 5

Parameter : Gewichtsentwicklung, Serumphosphat, Serumcalcium, alkalische Phosphatase im Serum, absoluter und relativer Knochenaschegehalt, Verkalkungsgrad der Weichgewebe (makroskopisch und mikroskopisch)

ERGEBNISSE

Versuchsverlauf:

Da die Versuchstierzuchtanstalt Lieferschwierigkeiten hatte, mußte aus technischen Gründen die Vorperiode auf fünf Tage gekürzt werden. Das durchschnittliche Anfangsgewicht der Kaninchen betrug deshalb nur 1540 Gramm. Ein der Gruppe 3 zugeordnetes Tier fiel in den Anfangstagen wegen einer massiven Coccidieninfektion als Versuchstier aus. Ein mit 0.45 nmol 1,25(OH)₂D₃ pro Tier und Tag behandeltes Kaninchen starb nach zehn Tagen an urämischer Gastritis und Enterocolitis.

Gewichtsentwicklung (Abbildung 6)

Die geringsten Zunahmen zeigten die Tiere denen 1,25-Dihydroxycholecalciferol oder sein nur am Kohlenstoffatom C-1 hydroxyliertes Analog verabreicht wurde. Eine etwas bessere Gewichtsentwicklung war bei den mit 1,25(OH)₂D₂ bzw. 1 α (OH)D₂ behandelten Kaninchen zu verzeichnen. Mit Ausnahme der Gruppe 3 (1,25(OH)₂D₂) unterschieden sich alle anderen mit P < 0.05 statistisch signifikant von der Kontrolle.

Serumphosphat (Tabelle 18)

Bei allen mit Vitamin D-Metaboliten behandelten Tieren kam es zu einem Anstieg der Phosphatkonzentration im Serum. Die

geringste Erhöhung zeigten die mit 0.9 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ behandelten Kaninchen. Der Serumphosphatgehalt der Kontrolltiere sank dagegen. Die mit 1,25 hydroxylierten Metaboliten sowie 1α -Hydroxyvitamin D_3 behandelten Kaninchen, unterschieden sich bezüglich ihrer Phosphatkonzentrationen im Serum signifikant von den Kontrolltieren ($P < 0.05$).

Serumcalcium (Tabelle 19)

Die Serumcalciumkonzentrationen nahmen bei den mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ behandelten Kaninchen zu, während sie sich bei allen anderen Tieren kaum veränderte. Eine Signifikanz war nicht nachweisbar.

Alkalische Phosphatase im Serum (Tabelle 20)

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase reduzierte sich bei den Kaninchen, welche $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bzw. $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ verabreicht bekamen am stärksten. Auch bei den mit $1,25$ -Dihydroxyvitamin D_2 bzw. seinem nur einfach hydroxylierten Analog behandelten Tieren war sie erniedrigt, der Wert der Kontrolltiere blieb dagegen relativ konstant.

Absoluter und relativer Knochenaschegehalt (Tabelle 21)

Der absolute Knochenaschegehalt variierte bei den einzelnen Gruppen kaum. Der relative Gehalt der Knochenasche war bei den mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ behandelten Kaninchen etwas höher.

Untersuchung der Weichgewebe:

1. Pathologisch-anatomische Befunde (Tabelle 22)

Jeweils vier der mit $1,25$ -Dihydroxycholecalciferol bzw. der doppelten Dosis des einfach hydroxylierten Analoges behan-

delten Tiere zeigten starke Verkalkungen in der Aortenwurzel und der Aorta thoracica. Das nach Gabe von 0.45 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an urämischer Gastritis gestorbene Kaninchen sowie zwei der mit 0.90 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ behandelten Tiere, hatten auch in der Aorta abdominalis Kalkherde.

Während nur eines der mit 0.45 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ behandelten Kaninchen starke Kalkablagerungen im Aortenursprung und der Aorta thoracica aufwies, zeigten die anderen dieser Gruppe zugehörigen Tiere kaum Veränderungen. Kleine Kalkherde wurden in der Aortenwurzel und bei einem weiteren Tier auch in der Aorta thoracica festgestellt.

0.90 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ pro Tier und Tag führten ebenfalls zu nur winzigen Kalkknöpfe im Aortenursprung. Zwei Tiere aus dieser Gruppe hatten auch geringgradige Kalkablagerungen in der Aorta thoracica.

Bei zwei Kaninchen der Kontrollgruppe wurden mehrere, bei einem weiteren nur ein Kalkherd im Aortenbogen festgestellt. In keinem Fall traten Verkalkungen in der Aorta thoracica oder Aorta abdominalis auf.

2. Pathologisch-histologische Befunde (Tabelle 23)

Bei den mit $1,25$ hydroxylierten Metaboliten bzw. $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ behandelten Kaninchen zeigte sich das Bild einer Nephrocalcinose. Sehr starke Kalkablagerungen in den Tubulusepithelien und Kalkzylinder in den Harnkanälchen der Nierenrinde sowie in der Markzone wurden festgestellt. Zum Teil kam es auch zu Verkalkungen in der Media und Lamina elastica interna der Nierenarterien. Nur bei einem Kaninchen zeigte sich nach Gabe von 0.45 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ eine lediglich geringgradige Verkalkung der Niere. Kalkablagerungen an den Basalmembranen der Bronchialepithelien waren bei jeweils zwei der mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ sowie bei vier der mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ behandelten Kaninchen feststellbar. Verkalkungen der Lamina elastica interna der Arteria carotis wies jeweils ein Tier aus diesen Gruppen auf.

0.90 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ pro Tier und Tag führten zu wesentlich geringeren Veränderungen. Nur bei drei Tieren dieser Gruppe kam es sehr geringgradig zu Kalkablagerungen in den Tubulus-

epithelien.

Verkalkungen am Ansatz der Semilunarklappen des linken Herzens wurde bei je einem der mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ behandelten Tiere beobachtet. In diesen Gruppen kamen auch primäre Verkalkungen der Basalmembranen der Magendrüsen vor. Die Kontrolltiere wiesen mit Ausnahme der bereits festgestellten Spontanverkalkungen keine weiteren Veränderungen auf.

Abbildung 6: Gewichtsentwicklung

Durchschnittliches Körpergewicht der
Versuchstiere pro Gruppe
(Versuch 4 ; n = 5)
(*) signifikant mit $P < 0.05$.

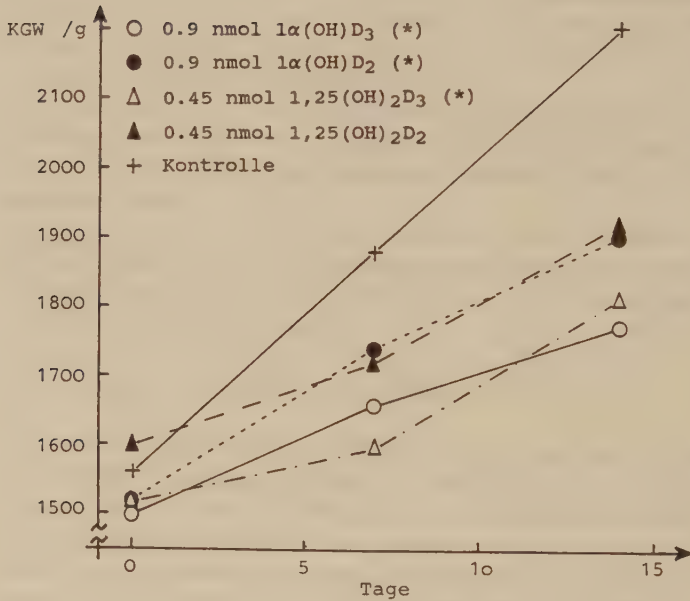


Tabelle 18: Serumphosphatgehalt

(Versuch 4 ; n = 5)

(*) statistisch signifikant (P < 0.05)

Gr.	Gabe pro Tier u. Tag	Serumphosphatgehalt in mg / 100 ml		
		Tag 0 $\bar{x} \pm s$	Tag 7 $\bar{x} \pm s$	Tag 14 $\bar{x} \pm s$
1	Kontrolle	7.5 $\pm$ 2.1	8.3 $\pm$ 0.4	6.5 $\pm$ 0.6
2	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	6.5 $\pm$ 1.0	8.4 $\pm$ 1.2	8.5 $\pm$ 1.4 (*)
3	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	6.3 $\pm$ 0.9	7.4 $\pm$ 0.9	8.9 $\pm$ 0.5 (*)
4	0.90 nmol 1 α (OH)D ₃	6.3 $\pm$ 1.7	7.8 $\pm$ 1.0	8.5 $\pm$ 1.5 (*)
5	0.90 nmol 1 α (OH)D ₂	6.7 $\pm$ 0.7	7.2 $\pm$ 1.3	7.6 $\pm$ 1.3

Tabelle 19: Serumcalciumgehalt

(Versuch 4 ; n = 5)

Gr.	Gabe pro Tier u. Tag	Serumcalciumgehalt mg / 100 ml		
		Tag 0 $\bar{x} \pm s$	Tag 7 $\bar{x} \pm s$	Tag 14 $\bar{x} \pm s$
1	Kontrolle	13.6 $\pm$ 0.6	13.2 $\pm$ 0.4	13.8 $\pm$ 1.0
2	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	13.4 $\pm$ 0.6	13.4 $\pm$ 0.6	15.3 $\pm$ 0.9
3	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	13.3 $\pm$ 0.6	13.0 $\pm$ 0.4	14.6 $\pm$ 0.6
4	0.90 nmol 1 α (OH)D ₃	13.0 $\pm$ 1.4	13.1 $\pm$ 0.6	13.8 $\pm$ 1.6
5	0.90 nmol 1 α (OH)D ₂	13.7 $\pm$ 0.8	13.3 $\pm$ 0.6	12.9 $\pm$ 1.4

Tabelle 20: Alkalische Phosphatase im Serum

VB = Versuchsbeginn, VE = Versuchsende
(.) = Serumpool
(Versuch 4 ; n = 5)

Gruppe	Gabe pro Tier u. Tag	alkalische Phosphatase units/l	
		VB $\bar{x} \pm s$	VE $\bar{x} \pm s$
1	Kontrolle	87	93 (.)
2	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	89	65 (.)
3	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	89	75 (.)
4	0.90 nmol 1 α (OH)D ₃	83 $\pm$ 18	56 $\pm$ 21
5	0.90 nmol 1 α (OH)D ₂	93 $\pm$ 15	67 $\pm$ 11

Tabelle 21: Absoluter und relativer Knochenaschegehalt

(Versuch 4 ; n = 5)

Gruppe	Gabe pro Tier u. Tag	Knochenaschegehalt	
		in g $\bar{x}$	in % TS $\bar{x}$
1	Kontrolle	2.6	52.8
2	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	2.6	54.0
3	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	2.7	54.4
4	0.90 nmol 1 α (OH)D ₃	2.6	57.6
5	0.90 nmol 1 α (OH)D ₂	2.7	55.9

Tabelle 22: Verkalkungsgrad der Aorta (makroskopisch)
 (Versuch 4 ; Versuchsdauer 14 Tage ; n = 5)
 (1) am 8. Versuchstag an Urämie gestorben
 (2) nicht im Versuch
 Zeichenerklärung siehe Tabelle 4, Seite 39

Gabe pro Tier u. Tag		untersuchtes Organ		
		Aortenwurzel	Aorta thorac.	Aorta abdom.
Kontrolle	1a	-	-	-
	1b	+	-	-
	1c	+	-	-
	1d	+	-	-
0.45 nmol 1.25(OH) ₂ D ₃	2a	+	+	-
	2b	+	+	-
	2c	+	+	+
	2d	+	-	-
	2e	+	+	-
0.45 nmol 1.25(OH) ₂ D ₂	3a	+	-	-
	3b	-	-	-
	3c			-
	3d	+	+	-
	3e	+	+	-
0.90 nmol 1 α (OH)D ₃	4a	+	-	-
	4b	+	+	-
	4c	+	+	+
	4d	+	+	-
	4e	+	+	+
0.90 nmol 1 α (OH)D ₂	5a	+	+	-
	5b	+	-	-
	5c	+	-	-
	5d	+	+	-

Tabelle 23: Verkalkungsgrad der Weichgewebe (mikroskopisch)
(Versuch 4 ; Versuchsdauer 14 Tage ; n = 5)
(1) nicht im Versuch
Zeichenerklärung siehe Tabelle 5, Seite 40

Gabe pro Tier u. Tag	Herzvor- kammer	Aorten- wurzel	untersuchtes Organ			Lunge	Arteria carotis	Magen- Darm
			Aorta thorac.	Aorta abdom.	Niere			
Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	m	-	-	-	-	-	-
	-	m	-	-	-	-	-	-
	-	m	-	-	-	-	-	-
0.45 nmol 1.25(OH) ₂ D ₃	+	m	m	-	+	-	-	-
	-	m	m	-	+	+	+	+
	-	m	m	m	+	+	+	+
	+	m	-	+	+	+	+	+
0.45 nmol 1.25(OH) ₂ D ₂	-	m	-	-	+	-	-	-
	-	-	-	-	+	-	-	-
	-	m	-	-	+	-	-	-
	-	m	m	+	+	+	+	+
0.9 nmol 1α(OH) ₂ D ₃	+	m	-	-	+	-	-	-
	-	m	m	-	+	+	+	+
	-	m	m	m	+	+	+	+
	-	m	m	m	+	+	+	+
0.9 nmol 1α(OH) ₂ D ₂	+	m	m	m	+	+	+	+
	-	m	-	-	+	-	-	-
	-	m	-	-	+	-	-	-
	-	m	m	-	+	+	+	+

4.5 VERGLEICHENDE CALCINOGENITÄT VON $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (A) UND
 $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ (B). A:B = 1.5:4.5 (VERSUCH 5)

Ein Unterschied in der Calcinogenität der beiden im Stoffwechsel aus Vitamin D_2 und D_3 entstehenden Metabolite wurde durch Versuch 4 deutlich. Während 0.45 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pro Tier und Tag stark calcinogen wirkten, traten bei äquimolarer Menge an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ nur geringe Verkalkungen der Weichgewebe auf. Eines der mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ behandelten Kaninchen wies jedoch makroskopisch kaum Verkalkungen auf. Ein anderes, dem das entsprechende Vitamin D_2 -Analog verabreicht wurde, war dagegen stark verkalkt. Leider befanden sich in dieser $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ -Gruppe nur vier Versuchstiere. Die geringe Tierzahl pro Gruppe und die unterschiedliche individuelle Reaktion auf die jeweiligen Metabolite führte dazu, beide Substanzen in der gleichen Dosierung nochmals einzusetzen.

1.20 nmol bzw. 0.90 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ pro Tier und Tag wirkten mittel bis stark calcinogen, während die äquimolaren Mengen $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ nur sehr geringgradige Verkalkungen verursachten. Um nun auch für $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ eine höhere Calcinogenität zu erreichen, wurden die Dosierungen für die beiden lediglich am Kohlenstoffatom C-1 hydroxylierten Komponenten erhöht. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ wurden im Verhältnis 1.5 : 4.5 eingesetzt.

Da die letzten drei Versuche unter standardisierten Bedingungen abliefen, verzichteten wir diesmal auf die Kontrollgruppe. Dafür wurde eine weitere Gruppe gebildet, die die doppelte der jetzt neu festgesetzten Menge an $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ erhielt. Damit wurde versucht denjenigen Konzentrationsbereich zu finden, in dem auch $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ seine höchste Calcinogenität erreicht. Somit ergab sich für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ ein Verhältnis von 1.5 : 9.

Versuchsanordnung :

Gruppe 1 : 0.45 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Gruppe 2 : 0.45 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$

Gruppe 3 : 1.35 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$

Gruppe 4 : 1.35 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$

Gruppe 5 : 2.70 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$

Verabreichungsform : oral

Vorperiode : 5 Tage

Hauptperiode : 14 Tage

Tierzahl pro Gruppe : n = 5

Parameter : Gewichtsentwicklung, Serumphosphat, Serumcalcium, alkalische Phosphatase im Serum, absoluter und relativer Knochenaschegehalt, Verkalkungsgrad der Weichgewebe (makroskopisch und mikroskopisch)

ERGEBNISSE

Versuchsverlauf:

Bereits nach 5 Tagen starben zwei der vier mit 2.70 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ behandelten Versuchstiere. Die Serumwerte dieser Gruppe wurden aufgrund der mangelnden Aussagekraft nur in den Tabellen aufgeführt. Von den Kaninchen die 1.35 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ verabreicht bekamen starb eines nach 8 Tagen, zwei weitere nach 11 Tagen. Ein mit der äquimolaren Menge $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ behandeltes Tier verendete nach 12 Tagen. Die Todesursache war in allen Fällen eine urämische Gastritis und Enterocolitis. Die Tiere verloren in den letzten Stunden sehr viel Gewicht, zeigten schleimigen Kot, Polydipsie und Anorexie. Die Phosphatkonzentration im Serum stieg infolge der Urämie extrem an.

Gewichtsentwicklung (Abbildung 7)

Die mit 0.45 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bzw. mit 1.35 nmol der nur einfach hydroxylierten Metabolite behandelten Kaninchen zeigten ein sehr geringes Wachstum. Im Unterschied dazu wiesen die Tiere die 0.45 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ bekamen, gute Zunahmen auf.

Eine Signifikanz der Gruppen 1 und 4 gegenüber der Gruppe 2 war nachweisbar ($P < 0.025$). Die beiden überlebenden Tiere der Gruppe 5 zeigten ein den Gruppen 1, 3 und 4 entsprechendes Wachstum.

Serumphosphat (Tabelle 24)

Die Phosphatkonzentration im Serum entsprach bei den mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ behandelten Tieren, nach einer kurzfristigen Erhöhung bei Versuchsende wieder dem Ausgangswert. Bei den Kaninchen der anderen Gruppen stiegen die Serumphosphatkonzentrationen in der Reihenfolge Gruppe 1 (0.45 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), Gruppe 4 (1.35 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$) und Gruppe 3 (1.35 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$) an. Dabei unterschieden sich die Gruppen 1 mit $P < 0.025$ und Gruppe 4 mit $P < 0.05$ signifikant von Gruppe 2.

Serumcalcium (Tabelle 25)

Die höchsten Konzentrationen wiesen in Übereinstimmung mit dem Versuch 4 diejenigen Kaninchen auf, denen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ verabreicht wurde. Die Serumcalciumkonzentration erhöhte sich ebenfalls bei den Tieren die 0.45 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erhielten, während sie bei den mit 1.35 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ behandelten Tieren sank. Die Gruppen 3 und 4 unterschieden sich signifikant von der Gruppe 2 ($P < 0.05$).

Alkalische Phosphatase im Serum (Tabelle 26)

Der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum erhöhte sich während der zweiwöchigen Behandlungsdauer mit $0.45 \text{ nmol } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. Bei den Kaninchen, denen die entsprechenden Mengen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder 1.35 nmol der beiden nur am Kohlenstoffatom C-1 hydroxylierten Analoge verabreicht wurden, sank die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum.

Absoluter und relativer Knochenaschegehalt (Tabelle 27)

Der absolute Gehalt der Knochenasche der mit 1α -Hydroxyvitamin D_3 behandelten Tiere war geringfügig niedriger als bei allen anderen. Der relative Knochenaschegehalt war bei den Kaninchen die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ erhielten höher.

Untersuchung der Weichgewebe:

1. Pathologisch-anatomische Befunde (Tabelle 28)

Die pathologischen Veränderungen der während des Versuches gestorbenen Kaninchen wurden in die nun folgenden Betrachtungen mit einbezogen. Analog zum Versuch 4 ergab sich auch hier für die mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ behandelten Kaninchen das gleiche Bild: die Tiere, die $0.45 \text{ nmol } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pro Tier und Tag erhielten, zeigten sehr starke Verkalkungen des Gefäßsystems und deutliche Veränderungen an den Nieren während diejenigen, die mit der äquimolaren Menge $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ behandelt wurden, nur geringe Kalkablagerungen im Aortenbogen aufwiesen.

$1.35 \text{ nmol } 1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ und die äquimolare Menge $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ verhielten sich bezüglich ihrer calcinogenen Aktivität ähnlich. Die jeweiligen Metabolite verursachten in dieser Dosierung starke Verkalkungen des Gefäßsystems. Eine Ausnahme bildete ein mit 1α -Hydroxyvitamin D_3 behandeltes Kaninchen, welches nur am Aortenursprung Verkalkungen mittleren Grades aufwies, und ein Tier das nach Aufnahme des entsprechenden D_2 -Analo-

ges lediglich mit einen kleinen Kalkherd in der Aorta thoracica reagierte.

Von den beiden bereits nach 5 Tagen gestorbenen Kaninchen der Gruppe 5 hatte nur eines mehrere Kalkknöpfe im Aortenbogen, die zwei geschlachteten Kaninchen dieser Gruppe wiesen dagegen sehr starke Verkalkungen entlang der gesamten Aorta auf.

Bei allen Kaninchen die grobsinnlich starke Gefäßwandverkalkungen zeigten, waren an der Nierenoberfläche weiße, diffus verteilte Stippchen und unter der Serosa von Magen und Darm weiße zum Teil konfluierende Herde sichtbar.

2. Pathologisch-histologische Befunde (Tabelle 29)

Bei allen Versuchstieren zeigte sich das Bild einer Nephrocalcinose. Dabei waren die Veränderungen bei den Tieren die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bzw. die $\text{C-}1\alpha$ hydroxylierten Metabolite erhielten, am stärksten ausgeprägt. Obwohl bei zwei mit $0.45 \text{ nmol } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ behandelten Kaninchen makroskopisch keine Veränderungen im Gefäßsystem festgestellt wurden, zeigten auch diese Tiere starke Kalkablagerungen in den Tubulusepithelien der Nieren und Kalkzylinder in den Harnkanälchen. Zwei weitere Kaninchen dieser Gruppe hatten dagegen nur sehr geringgradig Kalkpräzipitate in den Nieren.

Die Lungen der Gruppen 1 und 2 wurden nicht weiter untersucht. Die Behandlung mit 1α -Hydroxyvitamin D führte bei jeweils drei Tieren aus jeder Gruppe zu Kalkablagerungen an den Basalmembranen der Bronchialepithelien. Mit Hilfe der "von Kossa" Färbung konnte gezeigt werden, daß es sich bei den makroskopisch sichtbaren weißen Herden unter der Serosa von Magen und Darm tatsächlich um Kalkpräzipitate handelte.

Abbildung 7: Gewichtsentwicklung

Durchschnittliches Körpergewicht der
Versuchstiere pro Gruppe
(Versuch 5 ; n = 5)

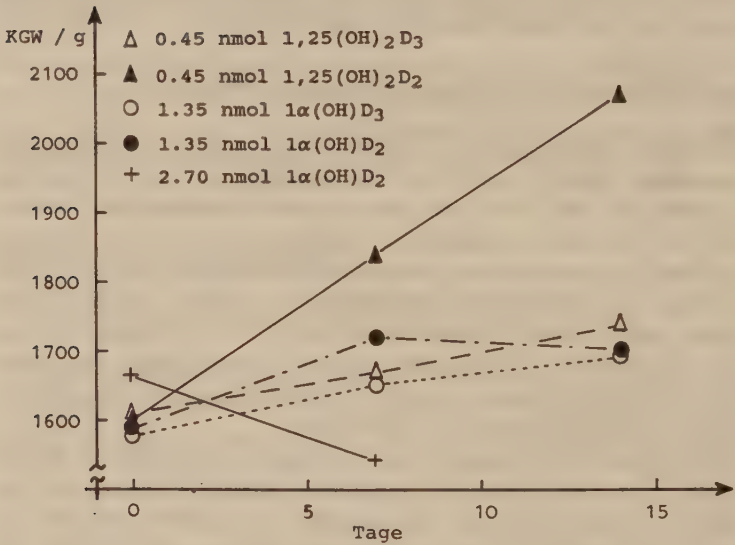


Tabelle 24: Serumphosphatgehalt

(Versuch 5 ; n = 5)

(*) statistisch signifikant (P < 0.05)

Gr.	Gabe pro Tier u. Tag	Serumphosphatgehalt in mg / 100 ml		
		Tag 0 $\bar{x} \pm s$	Tag 7 $\bar{x} \pm s$	Tag 14 $\bar{x} \pm s$
1	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	7.1 ± 1.1	10.0 ± 1.1	9.0 ± 0.6(*)
2	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	6.7 ± 1.2	8.6 ± 1.1	6.9 ± 1.2
3	1.35 nmol 1α(OH)D ₃	6.6 ± 1.6	10.2 ± 0.5	13.1 ± 7.3
4	1.35 nmol 1α(OH)D ₂	7.0 ± 0.6	9.7 ± 0.7	10.3 ± 5.1(*)
5	2.70 nmol 1α(OH)D ₂	6.9 ± 1.3	13.8 ± 7.2	8.7 ± 0.8

Tabelle 25: Serumcalciumgehalt

(Versuch 5 ; n = 5)

(*) statistisch signifikant (P < 0.05)

Gr.	Gabe pro Tier u. Tag	Serumcalciumgehalt mg / 100 ml		
		Tag 0 $\bar{x} \pm s$	Tag 7 $\bar{x} \pm s$	Tag 14 $\bar{x} \pm s$
1	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	13.8 ± 0.4	15.5 ± 1.7	16.4 ± 2.0
2	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	16.4 ± 1.8	15.2 ± 1.0	18.1 ± 3.2
3	1.35 nmol 1α(OH)D ₃	16.5 ± 2.2	16.5 ± 3.8	13.8 ± 2.0(*)
4	1.35 nmol 1α(OH)D ₂	17.0 ± 2.6	14.7 ± 1.4	13.6 ± 2.5(*)
5	2.70 nmol 1α(OH)D ₂	15.6 ± 2.3	11.2 ± 4.7	14.2 ± 0.3

Tabelle 26: Alkalische Phosphatase im Serum

VB = Versuchsbeginn, VE = Versuchsende
(·) = Serumpool
(Versuch 5 ; n = 5)

Gruppe	Gabe pro Tier u. Tag	alkalische Phosphatase units/l	
		VB $\bar{x} \pm s$	VE $\bar{x} \pm s$
1	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	98	69 (·)
2	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	66	83 (·)
3	1.35 nmol 1 α (OH)D ₃	74 $\pm$ 19	51 $\pm$ 20
4	1.35 nmol 1 α (OH)D ₂	86 $\pm$ 22	69 $\pm$ 20
5	2.70 nmol 1 α (OH)D ₂	77	-- (·)

Tabelle 27: Absoluter und relativer Knochenaschegehalt

(Versuch 5 ; n = 5)

Gruppe	Gabe pro Tier u. Tag	Knochenaschegehalt	
		in g $\bar{x}$	in % TS $\bar{x}$
1	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₃	2.7	57.4
2	0.45 nmol 1,25(OH) ₂ D ₂	2.7	50.2
3	1.35 nmol 1 α (OH)D ₃	2.5	52.8
4	1.35 nmol 1 α (OH)D ₂	2.6	56.6
5	2.70 nmol 1 α (OH)D ₂	2.6	58.3

Tabelle 28: Verkalkungsgrad der Aorta (makroskopisch)

(Versuch 5 ; Versuchsdauer 14 Tage ; n = 5)

- (1) am 11. Versuchstag an Urämie gestorben
 (2) am 8. Versuchstag an Urämie gestorben
 (3) am 12. Versuchstag an Urämie gestorben
 (4) am 5. Versuchstag an Urämie gestorben

Zeichenerklärung siehe Tabelle 4, Seite 39

Gabe pro Tier u. Tag		untersuchtes Organ		
		Aortenwurzel	Aorta thorac.	Aorta abdom.
0.45 nmol 1.25(OH) ₂ D ₃	1a	+ + + + +	+ + + + +	+ +
	1b	+ + + + +	+ + + + +	+ + +
	1c	+ + + + +	+ + + + +	+ + +
	1d	+	+ + +	+
	1e	+ + + + +	+ + + + +	+ + +
0.45 nmol 1.25(OH) ₂ D ₂	2a	+ + +	-	-
	2b	+	-	-
	2c	-	-	-
	2d	-	-	-
	2e	+	-	-
1.35 nmol 1α(OH)D ₃	3a	+ + + + +	+ + + + +	+
	3b	+ + + + +	+ + + + +	+
	3c	+ + + + +	+ + + +	+ + (1)
	3d	+ + +	+	+
	3e	+ + +	-	- (2)
1.35 nmol 1α(OH)D ₂	4a	-	+	-
	4b	+ + +	+ + + +	+
	4c	+ + + + +	+ + + + +	+
	4d	+ + + + +	+ + +	+
	4e	+ + + + +	+ + + + +	+ + (3)
2.70 nmol 1α(OH)D ₂	5a	+ + + + +	+ + + + +	+
	5b	+ + +	-	- (4)
	5c	-	-	- (4)
	5d	+ + + +	+ + + + +	+ +

Tabelle 29: Verkalkungsgrad der Weichgewebe (mikroskopisch)
(Versuch 5 ; Versuchsdauer 14 Tage ; n = 5)
Zeichenerklärung siehe Tabelle 5, Seite 40

Gabe pro Tier u. Tag	Herzvor- kammer	untersuchtes Organ				Lunge	Arteria carotis	Magen- Darm
		Aorten- wurzel	Aorta thorac.	Aorta abdom.	Niere			
0.45 nmol 1.25(OH) ₂ D ₃	1a 1b 1c 1d 1e	o o o o o	m m m m m	m m m m m	++ ++ ++ ++ ++	o o o o o	o o o o o	+ + + + +
0.45 nmol 1.25(OH) ₂ D ₂	2a 2b 2c 2d 2e	o o o o o	- - - - -	- - - - -	++ ++ ++ ++ ++	o o o o o	o o o o o	- - - - -
1.35 nmol 1α(OH)D ₃	3a 3b 3c 3d 3e	+ - - - -	m m m m m	m m m m m	++ ++ ++ ++ ++	- ++ ++ ++ ++	- - - - -	+ + + + +
1.35 nmol 1α(OH)D ₂	4a 4b 4c 4d 4e	- - - - -	+ m m m m	- m m m m	++ ++ ++ ++ ++	- ++ ++ ++ ++	- - - - -	- + + + +
2.70 nmol 1α(OH)D ₂	5a 5b 5c 5d	- - - -	m m m m	m - - m	++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	- - - -	+ + + +

5. DISKUSSION

5.1 VERGLEICH DER CALCINOGENEN WIRKUNG VON $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ UND $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Betrachtet man zusammenfassend die Ergebnisse der durchgeführten Fütterungsversuche, so zeigt sich, daß beim Kaninchen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ etwas calcinogener wirkt als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. Während nach oraler Gabe von 0.3 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Versuch 3) die verkalkende Wirkung der beiden Metabolite gerade erst einsetzt, diese Dosis für einen Wirkungsvergleich also zu niedrig ist, kommt bei einer Dosierung von 0.45 nmol (Versuch 4 und 5) die im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ merklich geringere Calcinogenität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ zum Ausdruck. Während 0.45 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ makroskopisch und mikroskopisch erkennbare starke Verkalkungen hervorrufen, ist bei äquimolarer Menge an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ die calcinogene Wirkung im wesentlichen auf die Niere beschränkt. Erst bei einer Dosierung von 0.6 nmol (Versuch 2) wird auch von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ die gleiche Calcinogenität wie von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erzielt. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist circa um den Faktor 1.5 - 2 calcinogener als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. Eine genaue Quantifizierung ist aus den vorliegenden Ergebnissen nicht zu erhalten.

Tabelle 30: Vergleichende makroskopisch erfaßte Calcinogenität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei verschiedenen Dosierungen

	0.3 nmol	0.45 nmol	0.6 nmol
$1.25(\text{OH})_2\text{D}_2$	gering	gering	stark
$1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$	gering	stark	stark

Aus der Literatur ist bekannt, daß einige Tierarten Vitamin D_2 und D_3 unterschiedlich verstoffwechseln (HORST et al., 1982; SOMMERFELDT et al., 1982) und dadurch die beiden Vita-

mine eine verschiedene Wirksamkeit haben. Hier wurden jedoch die bereits stoffwechselaktiven Metabolite oral verabreicht und damit die sonst notwendigen Metabolisierungsschritte umgangen.

Eine mögliche Erklärung der im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ geringeren Calcinogenität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, wäre eine unterschiedliche Absorption der beiden Metabolite am Darm. Um dies bestätigen zu können, müßte man ihre nach oraler Applikation entstandenen Plasmakonzentrationen messen. Vor allem bei ungenügender Gallensaftproduktion wird der polarere Metabolit $25(\text{OH})\text{D}_3$ schneller absorbiert als Vitamin D_3 (DAVIES et al., 1980). Da zwischen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aber nur ein sehr geringer Unterschied in der Polarität besteht ist es unwahrscheinlich, daß dieser zu einer unterschiedlichen intestinalen Absorption führt.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine verschiedene Affinität der beiden Metabolite zum Vitamin D-Binding-Protein. Vitamin D_3 weist im Gegensatz zum Vitamin D_2 eine höhere Affinität zum Vitamin D-Binding-Protein auf. Entsprechendes soll auch für die jeweiligen Metabolite gelten. Nach Hollis (HOLLIS, 1984) verändern die Hydroxylgruppen und bzw. oder Methylgruppe in der Vitamin D Seitenkette die Fähigkeit sich an das Vitamin D-Binding-Protein zu binden. Wenn die Affinität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zum Vitamin D-Binding-Protein im Blut höher ist, könnte dieser Metabolit auch schneller zu den Zielzellen transportiert werden und dort seine calcinogene Wirkung entfalten.

Eine unterschiedliche Affinität der beiden Metabolite zu den Rezeptoren verschiedener Zielzellen wäre eine weitere Möglichkeit um die im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ geringere calcinogene Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ zu verstehen. Die Rezeptoren der Zielzellen könnten zwischen den beiden Metaboliten aufgrund deren unterschiedlicher Konfiguration der Seitenkette diskriminieren. Über die Bindungsaffinitäten von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zum Cytosolrezeptor gibt es in der Literatur widersprüchliche Meinungen. Während bei einigen Autoren $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ eine geringere Affinität zum Rezeptor aufweist

(HUGES et al., 1976; JONES et al., 1980), besteht nach Eismann kein Unterschied in der Bindungsaffinität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ zum Rezeptor (EISMANN et al., 1976).

Da Vitamin D_2 mit der Nahrung aufgenommen werden muß, Vitamin D_3 dagegen im Organismus selbst synthetisiert wird, könnte das Vitamin D_2 und ebenso seine Metabolite auch als körperfremd angesehen, dadurch schneller aus dem Kreislauf eliminiert werden, und somit weniger calcinogen wirken.

5.2 VERGLEICH DER CALCINOGENEN WIRKUNG VON $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ UND $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$

Beim Vergleich der calcinogenen Wirkung von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ ergab sich ein der Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ähnliches Bild. Während nach Applikation von 0.60 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ (Versuch 2) nur mikroskopisch erkennbare geringgradige Verkalkungen in den Niere auftraten, die calcinogene Wirkung also gerade erst einsetzte, war nach Verabreichung von 1.35 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ bzw. der äquimolaren Menge $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ (Versuch 5) ein bei beiden Metaboliten gleich starker calcinogener Effekt zu verzeichnen. Nach oraler Gabe von 0.90 nmol und 1.20 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ bzw. den äquimolaren Mengen $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ (Versuch 3 und 4) wirkte wiederum der Vitamin D_3 -Metabolit stärker calcinogen. $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ ist etwa um den Faktor 1.5 - 2 calcinogener als $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$.

Tabelle 31: Vergleichende makroskopisch erfaßte Calcinogenität von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ bei verschiedenen Dosierungen

	0.6 nmol	0.9 nmol	1.2 nmol	1.35 nmol
$1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$	negativ	gering	gering	stark
$1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$	negativ	stark	stark	stark

Um biologische Aktivität zu erlangen muß $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ in der Leber zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ hydroxyliert werden (WALTERS et al., 1983). Die 25-Hydroxylierung von Vitamin D_3 durch mitochondriale und mikrosomale Enzyme der Rattenleber ist effizienter als diejenige von Vitamin D_2 (ANDERSSON et al., 1983; HOLMBERG, 1984). Die 25-Hydroxylierung von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ wird in vitro durch die gleiche mikrosomale Cytochrom P-450 Fraktion katalysiert wie das Vitamin D_3 (HOLMBERG et al., 1986). Wenn die für Vitamin D_3 festgestellte schnellere Metabolisierung auch in vivo für $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ gilt, so läßt sich durch die höhere Konzentration von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Serum, die im Gegensatz zu $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ höhere Calcinogenität von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ erklären.

Die stärkere calcinogene Wirkung von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ kann neben einer schnelleren Metabolisierung auch durch eine bessere Absorption am Darm, eine höhere Affinität zum Vitamin D-Binding-Protein, durch eine unterschiedliche Bindungsaffinität zum Cytosolrezeptor der Zielzellen, oder durch eine langsameren Elimination aus dem Kreislauf zustande kommen.

Da sich in den vorliegenden Fütterungsversuchen die beiden nur einfach hydroxylierten Metabolite zueinander ähnlich wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verhielten, kann man eine andere Metabolisierungsrate als Grund für die höhere Calcinogenität von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ weitgehend ausschließen.

5.3 VERGLEICH DER CALCINOGENEN WIRKUNG VON $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ UND $1\alpha(\text{OH})\text{D}$

Vergleicht man die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit der von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, so ergibt sich, daß beim Kaninchen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 2-3 mal calcinogener wirkt. Ebenso ist der calcinogene Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ 2 -3 mal so hoch wie der von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$. Da $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ seine biologischen Wirkungen durch Besetzung der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Rezeptoren ausübt (WALTERS et al., 1983), kann die unterschiedliche Calcinogenität nicht durch andere Rezeptorbindungen zustande kommen. Die geringere Toxizität von $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ könnte darin begründet sein, daß zur 25-Hydroxylierung das synthetische Substrat $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ in der Leber in einer

höheren Konzentration vorliegen muß um umgesetzt zu werden. Zum anderen könnte das durch die nötige Metabolisierung bedingte, langsamere Anfluten von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ im Blut auf den Organismus weniger toxisch wirken.

Während beim Kaninchen $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ weniger calcinogen wirkt als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, wurde bei der Maus eine höhere Toxizität von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ festgestellt (CROCKER et al., 1985). Auch die zur Zeit an unserem Institut stattfindenden Versuche an Ratten weisen auf eine im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ toxischeren Wirkung von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ hin. In hohen Konzentrationen ist $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ bezüglich der Calciumabsorption doppelt so wirksam wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Diese stärkere Absorption von Calcium, die an Ziegendärmen gemessen wurde, könnte dadurch zustande kommen, daß die Ausscheidung supraphysiologischer Dosen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, bei der aus $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ gebildeten Menge an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ langsamer erfolgt (HOVE, 1984). Die im Vergleich zu Ratte und Maus kontroverse Reaktion des Kaninchens könnte man vielleicht auf dessen Besonderheiten im Calciumstoffwechsel zurückführen. Es kann sich aber auch um eine für Ratte und Maus spezifische Reaktion handeln. Weitere Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen sind notwendig um dies zu klären.

5.4 DISKUSSION DER GEWICHTSENTWICKLUNG, SERUMPARAMETER UND KNOCHENASCHE

Da beim Kaninchen, trotz gleicher Versuchsbedingungen, eine große individuelle Variation im Umfang der morphologischen Veränderungen besteht (vgl. z.B. Versuch 4), wurden weitere Parameter zum Vergleich der calcinogenen Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ hinzugezogen.

Nimmt man die Gewichtszunahme als ein Maß für die Gesamtbelastung des Organismus durch die Toxizität der Testsubstanzen, so zeigt sich, daß bei 0.30 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ die toxische Wirkung der beiden Metabolite gerade einsetzte. Während in dieser Dosierung die makroskopisch feststellbaren Verkalkungen im Aortenursprung nicht stärker waren als bei

den Kontrolltieren, wurde die beginnende calcinogene Wirkung der beiden Metabolite durch die leichte Gewichtsdepression deutlich. Bei 0.6 nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ bzw. der äquimolaren Menge $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ war die bei beiden Substanzen gleiche, sehr starke calcinogene Wirkung mit einer entsprechend starken Gewichtsdepression korreliert. Die nach Gabe von 0.45 nmol festgestellte höhere Calcinogenität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde schon vor der Sektion durch das im Vergleich zur entsprechenden D_2 -Gruppe wesentlich niedrigere Gewicht deutlich. Durch die im Vergleich zur Kontrolle festgestellte geringere Gewichtszunahme der mit 0.6 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ behandelten Kaninchen konnte man die beginnende calcinogene Wirkung der beiden nur am Kohlenstoffatom C-1 hydroxylierten Metabolite erkennen. 0.9 nmol und 1.2 nmol $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ führten zu einer starken Gewichtsdepression, während die geringere calcinogene Wirkung der äquimolaren Mengen an $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ durch ein höheres Gewicht zum Ausdruck kam. Im Bereich von 1.35 nmol erreichte $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ die gleiche Calcinogenität wie die äquimolare Menge $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, dies zeigte sich durch die gleichen geringen Zunahmen der Kaninchen.

Die Bestimmung des Gehaltes an anorganischen Phosphor und der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum sind ebenfalls, wenn auch nicht so deutlich wie die Gewichtsentwicklung, geeignete Verfahren zum Nachweis der Calcinogenität der Vitamin D-Metabolite.

Die Betrachtung der einzelnen Ergebnisse zeigt, daß sich mit zunehmendem Grad der Verkalkung die Aktivität der alkalischen Phosphatase erniedrigt.

Nach Angaben in der Literatur (DIRKSEN und WOLF, 1976; TVEDEGAARD et al., 1983) ist beim Kaninchen die Zunahme des Mineralgehaltes der Aorta eng mit dem Gehalt an Serumphosphat verknüpft. Die Untersuchungen der Serumphosphatkonzentrationen bestätigen dies. Die auch makroskopisch stark verkalkten Kaninchen weisen einen statistisch signifikanten höheren Gehalt an anorganischem Phosphat im Serum auf als die Kontrollen. Der bei einigen Tieren aufgetretene plötzliche steile Anstieg der Phosphatkonzentration ist auf die als Folge der Vitamin D Toxizität entstandene Urämie zurückzu-

führen. Bei einer renalen Insuffizienz ist die Absorption von Phosphat am Darm stark erhöht, während sich die Calciumabsorption vermindert (TVEDEGAARD, 1985).

Ein bei anderen Tierarten nach Vitamin D Applikation und beginnender Verkalkung zu beobachtender Anstieg der Serumcalciumkonzentration findet beim Kaninchen nicht regelmäßig statt. Dies ist auf die Besonderheiten des Calciumstoffwechsels beim Kaninchen zurückzuführen.

Der Parameter Knochenasche ließ keine Tendenz der einzelnen Metabolite erkennen. Die Knochencaiummobilisierung soll bei $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ höher als bei $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ sein (REEVE et al., 1978; SJÖDEN et al., 1984a). Aufgrund der gleichen Metabolisierung wäre nach Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ ebenfalls mit einem im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ höheren Knochenaschegehalt zu rechnen. Die Mobilisierung und Einlagerung organischer Substanzen in den Knochen ist ein Vorgang der anfangs mit der Methode der Knochenaschebestimmung nur schlecht nachweisbar ist. Deshalb könnten nach einer längeren Versuchsdauer und einer höheren Zahl an Versuchstieren, Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen deutlich werden.

Neben der pathologisch-anatomischen und pathologisch-histologischen Untersuchung der Weichgewebe war die unterschiedliche calcinogene Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ am deutlichsten am Gewicht und ebenfalls an den Parametern Serumphosphat und alkalischer Phosphatase erkennbar.

5.5 ABSCHLIESSENDE BEMERKUNGEN

Die Fütterungsversuche an wachsenden Kaninchen ergaben, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ weniger calcinogen wirkt als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ ebenfalls geringere Verkalkungen als $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ verursacht. Damit scheinen die jeweiligen Vitamin D_2 - Metabolite therapeutisch interessant zu sein. Der Unterschied in der calcinogenen Wirkung liegt jedoch nur in einem engen Konzentrationsbereich.

Beim Vergleich der calcinogenen Wirkung von $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zeigte sich, daß $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ zwei bis drei mal weniger calcinogen wirkt. Ob damit nun die nur am Kohlenstoffatom C- 1α hydroxylierten Metabolite und dabei vor allem $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ den $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ - Präparaten im therapeutischen Einsatz vorzuziehen sind, läßt sich aus den vorliegenden Untersuchungen an nur einer Tierart nicht folgern.

Der systematische Vergleich der Calcinogenität der verschiedenen Vitamin D - Metabolite am Kaninchen ergibt insgesamt gesehen folgendes Bild: Die calcinogene Wirkung nimmt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ über $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ zum $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ ab.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In Fütterungsversuchen an wachsenden Kaninchen wurde die Calcinogenität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ vergleichend untersucht. Zur Beurteilung des Verkalkungsgrades wurde ein subjektives semiquantitatives Einteilungsverfahren angewandt. Weiter wurden die Parameter Gewicht, Serumphosphat, Serumcalcium, alkalische Phosphatase im Serum und der Knochenaschegehalt bestimmt.

Die makroskopischen und mikroskopischen Untersuchungen ergaben, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ weniger calcinogen wirkt als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ ebenfalls geringere Verkalkungen als $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ verursacht.

Vergleicht man die calcinogene Wirkung von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ bzw. $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ so zeigt sich deutlich, daß beim Kaninchen die 1α -Hydroxy-Metabolite weniger calcinogen wirken als die $1,25$ -Dihydroxy-Metabolite.

Ähnliche Ergebnisse erhält man bei Betrachtung der Gewichtsentwicklungen und der Serumparameter. Die bei den Kaninchen festgestellte Depression der Gewichtszunahme war mit der Schwere der Verkalkungen korreliert. Die unterschiedliche Wirkung der verschiedenen Substanzen war auch an den Veränderungen der Serumphosphatkonzentrationen und der alkalischen Phosphatase im Serum zu erkennen. Lediglich der Calciumgehalt im Serum und der absolute und relative Knochenaschegehalt ließen keine Abhängigkeiten erkennen.

Insgesamt gesehen ergibt sich folgende Reihung der Calcinogenität: Die beim Kaninchen am stärksten calcinogen wirkende Substanz stellt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dar, gefolgt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, während $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ die Verbindung mit der geringsten verkalkenden Wirkung darstellt. Ob damit die C- 1α hydroxylierten Metabolite den $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -Präparaten im therapeutischen Einsatz vorzuziehen sind, läßt sich aus den vorliegenden Untersuchungen an nur einer Tierart nicht folgern.

SUMMARY

COMPARATIVE CALCIFICATION OF DIFFERENT VITAMIN D - METABOLITES IN RABBITS

Feeding experiments on growing rabbits have been performed to investigate the calcinogenic effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in comparison to $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ and $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ respectively. The degree of calcification was classified in a subjective, but semi-quantitative procedure. Body weight, serum phosphorus, serum calcium, content of bone ash and serum alkaline phosphatase were also determined.

As a result of the macroscopic and microscopic investigations it has been demonstrated that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ was less calcinogenic than $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Likewise $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ caused less calcification than $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$.

The comparison of the calcinogenic effects induced by $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ with those of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, and $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ clearly demonstrated that in rabbits 1α -hydroxy metabolites were less calcinogenic than $1,25$ -dihydroxy metabolites.

Similar results were found by the observation of the serum parameters and the development of the weights. A correlation was found between the depression of the growth in weight and the severeness of the calcification. The influence of the various compounds was also noticable in changes in serum phosphorus concentration and serum alkaline phosphatase activity. Only serum calcium, and the absolute and relative contents of bone ash showed no dependence on the different metabolites.

The following rank of calcinogenic effects was deduced. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ is the severest calcinogenic compound followed by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ and $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$. $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ is the compound with the smallest calcinogenic effect. From these investigations,

performed only on one species (rabbits), it is not possible to decide in general whether 1α -hydroxy metabolites should be used for therapy preferably instead of 1,25-dihydroxy metabolites.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ANDERSSON, S., I. HOLMBERG and K. WIKVALL (1983):
25-Hydroxylation of C₂₇-steroids and vitamin D₃ by a
constitutive cytochrome P-450 from rat liver micro-
somes.
J. Biol. Chem. 258, 6777-6781.
- ASKEW, F.A., R.B. BOURDILLON, M.H. BRUCE, R.G. JENKINS and
T.A. WEBSTER (1931):
The distillation of vitamin D.
Proc. R. Soc. Lond. (Biol.) 107, 76-90.
- BALSAN, S., M. GARABEDIAN, V. COURTECUISSIE, J. GUERIS, J.P.
DOMMERGUES, L. CREIGNOU, M.J. Le DENUFF and J. RIVRON
(1977):
Long-term therapie with 1 α -hydroxyvitamin D₃ in
children with "pseudo-deficiency" rickets.
Clin. Endocrin. 7, (Suppl.), 225-230.
- BARAN, D.T. and M.L. MILINE (1983):
1,25-dihydroxyvitamin D induced inhibition of ³H-hy-
droxyvitamin D production by the rachitic rat liver in
vitro.
Calcif. Tissue Int. 35, 461-464.
- BAXTER, L.A. and H.F. DeLUCA (1976):
Stimulation of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase by
phosphate depletion.
J. Biol. Chem. 251, 3158-3161.
- BLAHOS, J., A.D. CARE and B.A. SOMMERVILLE (1983):
The effect of bethamethasone on duodenal calcium
absorption and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ production in
the chick.
Horm. Metab. Res. 15, 197-200.
- BLUNT, J.W., H.F. DeLUCA and H.K. SCHNOES (1968):
25-Hydroxycholecalciferol, a biologically active
metabolite of vitamin D₃.
Biochemistry 7, 3317-3322.
- BONJOUR, J.P., C. PRESTON and H. FLEISCH (1977):
Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on renal handling of
P_i in thyreoparathyroidectomized rats.
J. Clin. Invest. 60, 1419-1428.
- CHAPIN, R.E. and S.E. SMITH (1967):
The calcium tolerance of growing and reproducing
rabbits.
Cornell Vet. 57, 480-491.
- CHEEKE, P.R. and J.W. AMBERG (1973):
Comparative calcium excretion by rats and rabbits.
J. Anim. Sci. 37, 450-454.

- CHEN, P.S. and H.B. BOSMANN (1964):
Effect of vitamin D₂ and D₃ on serum calcium and
phosphorus in rachitic chicks.
J. Nutr. 83, 133-139.
- CHESNEY R.W., R.B. MAZZES, A.J. HAMSTRA, H.F. DeLUCA and
S. O'REAGAN (1978):
Reduction of serum 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in children
receiving glucocorticoids.
Lancet 2, 1123-1125.
- COSTANZO, L.S., P.R. SHEEHE and I.M. WEINER (1974):
Renal actions of vitamin D in D-deficient rats.
Am. J. Physiol. 266, 1490-1495.
- CROCKER, J.F.S., S.F. MUHTADIE, D.C. HAMILTON and
D.E.C. COLE (1985):
The comparative toxicity of vitamin D metabolites in
the weanling mouse.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 80, 119-126.
- DAHME, E. (1983):
Arterien.
In: Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der
Haustiere.
(Ed: E. Dahme, E. Weiss)
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 20-24.
- DAVIES, M. and P.H. ADAMS (1978):
The continuing risk of vitamin D intoxication.
Lancet ii, 621-623.
- DAVIES, M., E.B. MAWER and M.L. KRAWITT (1980):
Comparative absorption of vitamin D₃ and 25-hydroxy-
vitamin D₃ in intestinal disease.
Gut 21, 287-292.
- DeLUCA, H.F. and J.G. GHAZARIAN (1980):
The role of vitamin D and its metabolites in calcium
and phosphate metabolism.
In: Handbuch der inneren Medizin VI / 1A. Knochen,
Gelenke, Muskeln.
(Ed: Kuhlencordt F., H. Bartelheimer)
Springer-Verlag, Berlin, 173-196.
- DeLUCA, H.F. (1981):
The vitamin D system: A view from basic science to the
clinic.
Clin. Biochem. 14, 213-222.
- DeLUCA, H.F. and H.K. SCHNOES (1983):
Vitamin D: Recent advances.
Ann. Rev. Biochem. 52, 411-439.

- DIRKSEN, G., P. PLANK, T. HÄNICHEN und A. SPIESS (1972):
Über eine enzootische Calcinose beim Rind. 5. Experimentelle Untersuchungen am Kaninchen mit selektiver Verfütterung von Knaulgras (*Dactylis glomerata*), Goldhafer (*Trisetum flavescens*) und einem Gräsergemisch. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 79, 77-79.
- DIRKSEN, G. und M. WOLF (1976):
Über eine enzootische Calcinose beim Rind. Untersuchung über den Einfluß von *Trisetum flavescens* auf den Calcium- und Phosphorspiegel im Blutplasma des Kaninchens. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 83, 391-430.
- DYKMAN, T.R., K.M. HARALSON, Q.S. GLUCK, W.A. MURPHY, S.L. TEITELBAUM, T.J. HAHN und B.H. HAHN (1984):
Effect of oral 1,25-dihydroxyvitamin D and calcium on glucocorticoid-induced osteopenia in patients with rheumatic diseases.
Arthr. Rheum. 27, 1336-1343.
- EISMAN, J.E., A.J. HAMSTRA, B.E. KREAM and H.F. DeLUCA (1976):
1,25-dihydroxyvitamin D in biological fluids. A simplified and sensitive assay.
Science 193, 1021-1023.
- FISCHER, A. und R. HOFFMANN (1978):
D₃-Hypervitaminose beim Kaninchen.
Prakt. Tierarzt 59, 27-28.
- FLURY, W. und B. HALDIMANN (1981):
Therapie mit Vitamin D und D-Metaboliten.
Schweiz. Med. Wschr. 111, 314-321.
- FRANCESCHI, R.T. and H.F. DeLUCA (1981):
Characterization of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent calcium uptake in cultured embryonic chick duodenum.
J. Biol. Chem. 256, 3840-3847.
- FRASER, D.R. and E. KODICEK (1970):
Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite.
Nature 228, 764-766.
- FRASER, D., S.W. KOOH, H.P. KIND, M.F. HOLICK, Y. TANAKA and H.F. DeLUCA (1973):
Pathogenesis of hereditary vitamin D-dependant rickets. An inborn error of vitamin D metabolism involving defective conversion of 25-hydroxyvitamin D to 1,25-dihydroxyvitamin D.
New. Engl. J. Med. 289, 817-822.
- FRASER, D.R. (1981):
Biochemical and clinical aspects of vitamin D function.
Br. Med. Bull. 37, 37-42.

- FUCIK, R.F., S.C. KUKREJA, G.K. HARGIS, E.N. BOWSER, W.J. HENDERSON and G.A. WILLIAMS (1975):
Effects of glucocorticoids on function of the parathyroid glands in man.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 152-155.
- FUKUSHIMA, M., Y. NISHII, M. SUZUKI and T. SUDA (1978):
Comparative studies on the 25-hydroxylation of cholecalciferol and 1α -hydroxycholecalciferol in perfused rat liver.
Biochem. J. 170, 495-502.
- GALLAGHER, J.C., J. AARON, A. HORSMAN, R. WILKINSON and B.E.C. NORDIN (1973):
Corticosteroid osteoporosis.
Clinics Endocrinol. Metab. 2, 355-368.
- GALLAGHER, J.C., B.L. RIGGS and H.F. DeLUCA (1980):
Effect of estrogen on calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 51, 1359-1364.
- GARABEDIAN, M., Y. TANAKA, M.F. HOLICK and H.F. DeLUCA (1974):
Response of intestinal calcium transport and bone calcium mobilisation to $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in thyreoparathyreoidectomized rats.
Endocrinology 94, 1022-1027.
- GRAY, R.W., A.E. CALDAS, D.R. WILZ, J. LEMANN, G.A. SMITH and H.F. DeLUCA (1978):
Metabolism and excretion of 3H - $1,25(OH)_2$ -vitamin D_3 in healthy adults.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 46, 756-765.
- GRAY, T.K., G.E. LESTER and R.S. LORENCE (1979):
Evidence for a extrarenal 1α -hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D_3 in pregnancy.
Science 204, 1311-1313.
- HADDAD, J.G. and J. WALGATE (1976):
Radioimmunoassay of binding protein for vitamin D and its metabolites in human serum: Concentration in normal subjects and patients with disorders of mineral homeostasis.
J. Clin. Invest. 58, 1217-1222.
- HAHN, T.J. (1978):
Corticosteroid-induced osteopenia.
Arch. Intern. Med. 138, 882-885.
- HAHN, T.J. (1980):
Drug-induced disorders of vitamin D and mineral metabolism.
Clin. in. Endocrinol. and Metab. 9, 107-129.

- HAHN, T.J., L.R. HALSTEAD and D.T. BARAN (1981):
Effects of short term glucocorticoid administration on
intestinal calcium absorption and circulating vitamin D
metabolite concentrations in man.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 52, 111-115.
- HAHN, T.J., A. SHIRES and L.R. HALSTEAD (1983):
Serum dihydroxyvitamin D metabolite concentrations in
patients on chronic anticonvulsant drug therapie:
response to pharmacologic dosis of vitamin D₂.
Metab. Bone Dis. & Rel. Res. 5, 1-6.
- HALLORAN, B.P. and H.F. DeLUCA (1981):
Intestinal calcium transport: Evidence for two distinct
mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.
Arch. Biochem. Biophys. 208, 477-486.
- HARRINGTON, D.D. and E.H. PAGE (1983):
Acute vitamin D₃ toxicosis in horse: Case reports and
experimental studies of the comparative toxicity of
vitamins D₂ and D₃.
JAVMA 182, 1358-1369.
- HASS, G.M., E. RICHARD, M.D. TRUEHEART and A. HEMMENS
(1960):
Experimental arteriosklerosis due to hypervita-
minosis D.
Am. J. Path. 37, 521-539.
- HAUSSLER, M.R., D.J. BAYLINK, M.R. HUGHES, P.F. BRUMBAUGH,
J.E. WERGEDAL, F.H. SHEN, R.L. NIELSEN, S.J. COUNTS,
K.M. BURSAC and T.A. McCAIN (1976):
The assay of 1 α -25-dihydroxyvitamin D₃, physiologic and
pathologic modulation of circulating hormone levels.
Clin. Endocrin. 5, 151-165.
- HENRY, H.L. and A.W. NORMAN (1984):
Vitamin D: Metabolism and biological actions.
Ann. Rev. Nutr. 4, 493-520.
- HOLICK, M.F., H.K. SCHNOES and H.F. DeLUCA (1973):
1- α -Hydroxy derivative of vitamin D₃: A highly potent
analog of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃.
Science 180, 190-191.
- HOLLICK, M.H. and M.B. CLARK (1978):
The photobiogenesis and metabolism of vitamin D.
Fed. Proc. 37, 2567-2574.
- HOLLIS, B.W. (1984):
Comparison of equilibrium and disequilibrium assay
conditions for ergocalciferol, cholecalciferol and
their major metabolites.
J. Steroid. Biochem. 21, 81-86.

- HOLMBERG, I. (1984):
Differences in the metabolism of vitamin D₂ and vitamin D₃ by subcellular fractions from rat liver.
Biochim. Biophys. Acta 800, 106-109.
- HOLMBERG, I., T. BERLIN, S. EWERTH and I. BJÖRKHEIM (1986):
25-Hydroxylase activity in subcellular fractions from human liver. Evidence for different rates of mitochondrial hydroxylation of vitamin D₂.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 46, 785-790.
- HOLTROP, M.E., K.A. COX, M.B. CLARK, M.F. HOLICK and C.S. ANAST (1981):
1,25-Dihydroxycholecalciferol stimulates osteoclasts in rat bones in the absence of parathyroid hormone.
Endocrinology 108, 2292-2301.
- HORST, R.L., J.L. NAPOLI and E.T. LITTLEDIKE (1982):
Discrimination in the metabolism of orally dosed ergocalciferol and cholecalciferol by the pig, rat and chick.
Biochem. J. 204, 185-189.
- HOVE, K. (1984):
Effects of 1 α -hydroxylated metabolites of cholecalciferol on intestinal radiocalcium absorption in goats.
Brit. J. of Nutr. 51, 157-164.
- HUGHES, M.R., D.J. BAYLINK, P.G. JONES and M.R. HAUSSLER (1976):
Radioligand receptor assay for 25-hydroxyvitamin D₂ / D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₂ / D₃: application to hypervitaminosis D.
J. Clin. Invest. 58, 61-70.
- HULDSHINSKY, K. (1919):
Heilung durch künstliche Höhensonne.
Dtsch. Med. Wochenschr. 45, 712-713.
- HUNT, R.D., F.G. GRACIA and D.M. HEGSTED (1967):
A comparison of vitamin D₂ and vitamin D₃ in new world primates. 1. Production and regression of osteodystrophia fibrosa.
Lab. Anim. Care 17, 222-232.
- IMRIE, M.H., P.F. NEVILLE, A.W. SNELGROVE and H.F. DeLUCA (1967):
Metabolism of vitamin D₂ and vitamin D₃ in the rachitic chick.
Arch. Biochem. Biophys. 120, 525-532.
- IVANHOE, F. (1970)
Was Virchow right about Neandertal?
Nature (London) 227, 577-579.
- JONES, G., H.K. SCHNOES and H.F. DeLUCA (1975)
Isolation and identification of 1,25(OH)₂D₃.
Biochemistry 14, 1250-1256.

- JONES, G., L.A. BAXTER, H.F. DeLUCA and H.K. SCHNOES (1976a):
Biological activity of 1,25-dihydroxyvitamin D₂ in the chick.
Biochemistry, 15, 713-716.
- JONES, G., H.K. SCHNOES and H.F. DeLUCA (1976b):
An in vitro study of vitamin D₂ hydroxylases in the chick.
J. Biol. Chem., 251, 24-28.
- JONES, G., B. BYRNES, F. PALMA, D. SERGEV and J. MAZUR (1980):
Displacement potency of vitamin D₂ analogs in competitive protein-binding assays for 25-hydroxyvitamin D₃, 24,25-dihydroxyvitamin D₃ and 1,25(OH)₂D₃.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 50, 773-776.
- KABAKOFF, B., N.C. KENDRICK and H.F. DeLUCA (1982):
1,25-Dihydroxyvitamin D₃-stimulated active uptake of phosphate by rat jejunum.
Am. J. Physiol. 243, 470-475
- KAMPHUES, J., P. CARSTENSEN, D. SCHROEDER, H. MEYER, H.-A. SCHOON and M. ROSENBRUCH (1986):
Effekte einer steigenden Calcium- und Vitamin D-Zufuhr auf den Calciumstoffwechsel von Kaninchen.
J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr. 56, 191-208.
- KLEIN, R.G., S.B. ARNAUD, J.C. GALLAGHER, H.F. DeLUCA and B.L. RIGGS (1977):
Intestinal calcium absorption in exogenous hypercortisonism.
J. Clin. Invest. 60, 253-259.
- KOOH, S.W., D. FRASER, H.F. DeLUCA, M.F. HOLICK, R.E. BELSEY, M.B. CLARK and T.M. MURRAY (1975):
Treatment of hypoparathyroidism and pseudohypoparathyroidism with metabolites of vitamin D: evidence for impaired conversion of 25-hydroxyvitamin D to 1 α -25-dihydroxyvitamin D.
New Eng. J. Med. 293, 840-844.
- KREITMAIR, H. und T. MOLL (1928):
Hypervitaminose durch große Dosen Vitamin D.
Münchener Med. Wochenschr. 75, 637-639.
- KREMER, R. and D. GOLTZMAN (1982):
Parathyroid hormone stimulates mammalian renal 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase in vitro.
Endocrinology 110, 294-296.
- KRUSE, H.-P. und F. KUHLENCORDT (1980):
Osteomalazie.
In: Handbuch der inneren Medizin, Bd.6, Teil 1B. (Ed. F. Kuhlencordt, H. Bartelheimer)
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 751.

- KRUSE, H.-P. (1985):
Behandlung mit Vitamin D, D-Hormonen und synthetischen
Analogen.
Dtsch. med. Wschr. 110, 66-70.
- LAM, H.-Y., H.K. SCHNOES and H.F. DeLUCA (1974):
 1α -Hydroxyvitamin D₂: a potent synthetic analog of
vitamin D₂.
Science 186, 1038-1040.
- LAM, H.-Y., H.K. SCHNOES and H.F. DeLUCA (1977):
Synthesis of 1α -hydroxyergocalciferol.
Steroids 30, 671-676.
- LEE, M.R., L.J. DEFTOS and J.T. POTTS (1969):
Control of secretion of thyrocalcitonin in the rabbit
as evaluated by radioimmunoassay.
Endocrinology 84, 36-40.
- LINDGREN, J.U., S. LINDHOLM and B. SARBY (1978):
Short term effects of 1-alpha-hydroxyvitamin D₃ in
patients on corticosteroid treatment and in patients
with senile osteoporosis.
Acta Med. Scand. 204, 89-92.
- LINDQUIST, B. (1952):
The effect of vitamin D on the metabolism of radiocal-
cium in rachitic rats.
Acta Paediatr. (Stockholm) 41, (Suppl. 86), 1-80.
- LINDT, S. (1968):
D-hypervitaminotische Calcinose bei verschiedenen
Tieren.
Wien. Tierärztl. Mschr. 55, 148-164.
- LITTLEDIKE, E.T. and R.L. HORST (1982):
Vitamin D₃ toxicity in dairy cows.
J. Dairy Sci. 65, 749-759.
- LITVAK, J., M.P. MOLDAWER, A.P. FORBES and P.H. HENNEMAN
(1958):
Hypocalcemic hypercalciuria during vitamin D and di-
hydrotachysterol therapy of hypoparathyroidism.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 18, 246-252.
- LONG, R.G., R.K. SKINNER, M.R. WILLS and S. SHERLOCK (1976):
Serum 25-hydroxyvitamin D in untreated parenchymal and
cholestatic liver disease.
Lancet II, 650-652.
- LUND, J. and H.F. DeLUCA (1966):
Biologically active metabolite of vitamin D₃ from bone,
liver and blood serum.
J. Lipid Res. 7, 739-744.

- MAWER, E.B. (1982):
Functional control over the metabolic activation of
cholecalciferol.
In: Endocrinology of calcium metabolism.
(Ed. J.A. Parsons)
Raven Press, New York, 271-295.
- MAWER, E.B., J.T. HANN, J.L. BERRY and M. DAVIES (1985):
Vitamin D metabolism in patients intoxicated with
ergocalciferol.
Clin. Sci. 68, 135-141.
- MCCOLLUM, E.V., N. SIMMONDS, J.E. BECKER et al. (1922):
Studies on experimental rickets. XXI. An experimental
demonstration of the existence of a vitamin which
promotes calcium deposition.
J. Biol. Chem. 53, 293-312.
- MELLANBY, E. (1919):
An experimental investigation on rickets.
Lancet 1, 407-412.
- MILLER, S.M. (1983):
New perspectives on vitamin D.
Am. J. Med. Technol. 49, 27-37.
- NAPOLI, J.L., M.A. FIVIZZANI, H.K. SCHNOES and H.F. DeLUCA
(1979):
Synthesis of vitamin D₅: Its biological activity.
Relative to vitamins D₃ and D₂.
Arch. Biochem. Biophys., 197, 119-125.
- NICOLAYSEN, R. (1937):
Studies upon the mode of action of vitamin D₃. The
influence of vitamin D on the absorption of calcium and
phosphate in the rat.
Biochem. J. 31, 122-129.
- NIELSEN, H.E., I.K. ROMER, F. MELSEN, M.S. CHRISTENSEN
and H.E. HANSEN (1980):
1 α -hydroxyvitamin D₃ treatment of non-dialyzed patients
with chronic renal failure. Effects on bone, mineral
metabolism and kidney function.
Clin. Nephrol. 13, 103-108.
- NORDIN, B.E.C. (1973):
In: Metabolic bone and stone disease.
(Ed. B. Nordin)
Churchill Livingstone, Edinburgh and London, 66;255.
- NORMAN, A.W. (1979):
Animal health applications.
In: Vitamin D. The calcium homeostatic steroid hormone.
(Ed. A.W. Norman)
New York, Academic Press, 445-450.

- NORMAN, A.W., J. ROTH and L. ORCI (1982a):
The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors and biological response (calcium binding proteins).
Endocrine Reviews 3, 331-366.
- NORMAN, A.W., K. SCHÄFER, D. v. HERRATH and H.-G. GRIGOLEIT (1982b):
Vitamin D: Chemical, biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism.
(Ed. A.W. Norman, K. Schäfer, D.v. Herrath, H.G. Grigoleit)
Walter de Gruyter, Berlin / New York.
- PAAREN, H.E., H.F. DeLUCA and H.K. SCHNOES (1980):
Direct C(1) hydroxylation of vitamin D₃ and related compounds.
J. Org. Chem. 45, 3253-3258.
- PARFITT, A.M., J.C. GALLAGHER, R.R. HEANEY, C.C. JOHNSEN, P. NEER and G.D. WHEDIN (1982):
Vitamin D and bone health in the elderly.
Am. J. Clin. Nutr. 36, 1014-1031.
- RAMBECK, W.A., H. WEISER and H. ZUCKER (1984):
Biological activity of 1 α ,25-dihydroxyergocalciferol in rachitic chicks and in rats.
Internat. J. Vit. Nutr. Res. 54, 135-139.
- RAMBECK, W.A. and H. ZUCKER (1985):
Synergistic effects of 1,25(OH)₂D₃ and 24,25(OH)₂D₃ on duodenal CaBP in rachitic chicks and on eggshell weight in Japanese quails.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 126, 799-804.
- REEVE, L.E., H.K. SCHNOES and H.F. DeLUCA (1978):
Biological activity of 1 α -hydroxyvitamin D₂ in the rat.
Arch. Biochem. Biophys. 186, 164-167.
- REEVE, L.E., Y. TANAKA and H.F. DeLUCA (1983):
Studies on the site of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ synthesis in vivo.
J. Biol. Chem. 258, 3615-3617.
- REGAL, D.-S. (1982):
Die Bedeutung der Proteoglykane für die Verkalkung von Gewebe unter besonderer Berücksichtigung der Kalzinose.
Wien. tierärztl. Mschr., 69. Jahrgang, Heft 2, 41-44.
- ROSENSTREICH, S.J., C. RICH and W. VOLWILER (1971):
Deposition in and release of vitamin D₃ from body fat: Evidence for a storage site in the rat.
J. Clin. Invest. 50, 679-687.

- SEEMAN, E., R. KUMAR, G. HURDER, M. SCOTT, H. HEATH and B.L. RIGGS (1980):
Production, degradation and circulating levels of 1,25-dihydroxyvitamin D in health and in chronic glucocorticoid excess.
J. Clin. Invest. 66, 664-669.
- SEMMLER, E.J., M.F. HOLICK, H.K. SCHNOES and H.F. DeLUCA (1972):
The synthesis of 1α -25-dihydroxycholecalciferol - a metabolically active form of vitamin D₃.
Tetrahedron Lett. 40, 4147.
- SHEPARD, R.M., R.L. HORST, A.J. HAMSTRA and H.F. DeLUCA (1979):
Determinations of vitamin D and its metabolites in plasma from normal and anephric man.
Biochem. J. 182, 55-69.
- SIMONEN, O. (1986):
Osteoporosis: A big challenge to public health.
Calcif. Tissue Int. 39, 295-296.
- SJÖDEN, G.O.J., O. JOHNNELL, H.F. DELUCA and J.U. LINDGREN (1984a):
Effects of 1α -OH-D₂ on bone tissue. Studies of 1α -OH-D₂ and 1α -OH-D₃ in normal rats and in rats treated with prednisolone.
Acta Endocrinol. 106, 564-568.
- SJÖDEN, G., U. LINDGREN and H.F. DeLUCA (1984b):
Antirachitic activity of 1α -hydroxyergocalciferol and 1α -hydroxycholecalciferol in rats.
J. Nutr. 114, 2043-2046.
- SJÖDEN, G. and U. LINDGREN (1985a):
The effect of prednisolone on kidney calcification in vitamin D - treated rats.
Calcif. Tissue Int. 37, 613-616.
- SJÖDEN, G.O.J., J.U. LINDGREN and H.F. DeLUCA (1985b):
The effect of 1α -hydroxyvitamin D₂ on calcium metabolism in glucocorticoid - treated rats.
Bone 6, 231-234.
- SJÖDEN, G., C. SMITH, U. LINDGREN and H.F. DeLUCA (1985c):
 1α -hydroxyvitamin D₂ is less toxic than 1α -hydroxyvitamin D₃ in the rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 178, 432-436.
- SOMMERFELDT, J.L., J.L. NAPOLI, E.T. LITTLEDIKE, D.C. BEITZ and R.L. HORST (1983):
Metabolism of orally administered ergocalciferol and cholecalciferol by dairy calves.
J. Nutr. 113, 2595-2600.

- STANBURY, S.W., E.B. MAWER, C.M. TAYLOR and P. De SILVA (1980):
The skin, vitamin D and the control of its 25-hydroxylation.
Mineral. Elect. Metab. 3, 51-60.
- STEENBOCK, H. and A. BLACK (1924):
Fat-soluble vitamins. The induction of growth-promoting and calcifying properties in a rat by exposure to ultraviolet light.
J. Biol. Chem. 61, 405-422.
- STEVENSON, R.G., N.C. PALMER and G.G. FINLEY (1976):
Hypervitaminosis D in Rabbits.
Can. Vet. Jour. 17, 54-57.
- STRÖDER, J. and P. KASAL (1970):
Evaluation of phagocytosis in rickets.
Acta Paediat. Scand. 59, 288-292.
- TANAKA, Y., B. HALLORAN, H.K. SCHNOES and H.F. DeLUCA (1979):
In vitro production of 25-dihydroxyvitamin D₃ by rat placental tissue.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 5033-5035.
- TANAKA, Y., E. ABE, C. MIYAURA, T. KURIBAYASHI and K. KONNO (1982):
1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol and a human myloid leukemia cell line (HL-60).
Biochem. J. 204, 713-719.
- TJELLESEN, L., A. GOTFREDSEN and C. CHRISTIANSEN (1985a):
Different actions of vitamin D₂ and vitamin D₃ on bone metabolism in patients treated with phenobarbitone / phenytoin.
Calcif. Tissue Int. 35, 372-375.
- TJELLESEN, L., C. CHRISTIANSEN, P. RODBRO and L. HUMMER (1985b):
Different metabolism of vitamin D₂ and vitamin D₃ in epileptic patients on carbamazepine.
Acta Neurol. Scand. 71, 385-389.
- TVEDEGAARD, E., O. LADEFOGED, M. NIELSEN and O. KAMSTRUP (1983):
Effect of 1 α -hydroxyvitamin D₃ and dietary calcium and phosphate on the aortic mineral content in rabbits with mild azotemia.
Nephron 34, 185-191.
- TVEDEGAARD, E. (1985):
Absorption of calcium, magnesium and phosphate during chronic renal failure and the effect of vitamin D in rabbits.
Z. Versuchstierk. 27, 163-168.

URRY, D.W. (1971):

Neutral sites for calciumion binding to elastin and collagen: a charge neutralisation theory for calcification and its relationship to arteriosklerosis.
Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 810-814.

UNDERWOOD, J.L. and H.F. DeLUCA (1984):

Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralisation.
Am. J. Physiol. 246, E493-498.

VERNER, J.V., F.L. ENGEL and H.T. McPHERSON (1958):

Vitamin D intoxication: Report of two cases treated with cortisone.
Ann. Intern. Med. 48, 765-773.

VOIGTS, A.L., A.J. FELSENFELD and F. LIACH (1983):

The effects of calciferol and its metabolites on patients with chronic renal failure. 2. Calcitriol, 1α -hydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃.
Arch. Intern. Med. 143, 1205-1211.

WALTERS, M.R., W. HUNZIKER, J.E. BISHOP and A.W. NORMAN (1983):

Studies on the mode of action of vitamin D₃ and 1α -dihydroxyvitamin D₃: A long acting 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analog.
Calcif. Tissue Int. 35, 372-375.

WASSERMAN, R.H., R.A. CORRADINO and A.N. TAYLOR (1968):

Vitamin D-dependent calcium-binding protein. Purification and some properties.
J. Biol. Chem. 243, 3978-3986.

WASSERMAN, R.H. and C.S. FULLMER (1983):

Calcium transport proteins, calcium absorption and vitamin D.
Am. Rev. Physiol. 45, 375-390.

WEINSTEIN, R.S., J.L. UNDERWOOD, M.S. HUTSON and H.F. DeLUCA (1984):

Bone histomorphometry in vitamin D deficient rats infused with calcium and phosphorus.
Am. J. Physiol. 246, 499-505.

WEISS, E. (1983):

Niere.

In: Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere.

(Ed. Dahme E., E. Weiss)

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 223 und 238.

WINDAUS, A., O. LINSERT, A. LÜTTRINGHAUS and A. WEIDLICH (1932):

Über das kristallisierte Vitamin D₂.
Justus Liebings Ann. Chem. 492, 226-241.

- WINDAUS, A., F. SCHRENCK and F. WERDER (1936):
Über das antirachitisch wirksame Bestrahlungsprodukt
aus 7-dehydro-Cholesterin.
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 241, 100-103.
- YAMAMOTO, M., Y. KAWANOBE, H. TAKAHASHI, E. SHIMAZAWA,
S. KIMURA and E. OGATA (1984):
Vitamin D deficiency and renal calcium transport in
the rat.
J. Clin. Invest. 74, 507-513.
- YETGIN, S. and S. OZSOYLU (1982):
Myeloid metaplasia in vitamin D deficiency rickets.
Scand. J. Haematol. 28, 180-185.

DANKSAGUNG

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Herrn Professor Dr. H. Zucker danke ich herzlich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten an seinem Institut.

Ganz besonders gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. Dr. med. vet. habil. W.A. Rambeck für die Überlassung des Themas, seine gute Betreuung sowie den vielen Ratschlägen und Hilfen bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. J. von Sandersleben für die Möglichkeit, die pathologischen Untersuchungen am Institut für Tierpathologie der Universität München vornehmen zu können.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. T. Hänichen und seinen Mitarbeitern für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der pathologischen Untersuchungen und Anfertigung der zahlreichen histologischen Schnittpräparate bedanken.

Bei Frau A. Wetzel bedanke ich mich herzlich für ihre tatkräftige Unterstützung und viele Geduld bei der Bewältigung labortechnischer Probleme.

Den Tierpflegern, vor allem Herrn J. Reiter danke ich für die sehr gute Pflege meiner Versuchskaninchen.

Ein Dankeschön auch an alle Kolleginnen und Kollegen, die mir bei der Sektion der Tiere geholfen haben.

Ganz zum Schluß möchte ich meinen Eltern danken, die mir dieses Studium mit allen seinen Verpflichtungen und Freuden ermöglichten.

LEBENS LAUF

Brigitte Schäfer	geb. am 19. Juni 1959 in Coburg
Eltern	Karl Schäfer, Kaufmann Gottlinde Schäfer, geb. Bailony, Hausfrau
Schulbildung	1965 bis 1969 Besuch der Volksschule in Coburg (Rückertschule) 1969 bis 1979 Besuch des natur- wissenschaftlichen Zweiges des Gymnasiums Alexandrinum in Coburg
Abitur	27. Juni 1979
Studium	WS 79/80 bis SS 80 Studium der Diplombiologie an der Julius- Maximilian-Universität Würzburg WS 80/81 bis WS 85/86 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians Universität München
Staatsexamen	6. März 1986
Approbation	4. Juni 1986
Berufstätigkeit	April 1986, Beginn der Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation Oktober 1986 bis März 1987 Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physio- logie, Physiologische Chemie und Er- nährungsphysiologie der Tiermedi- zinischen Fakultät München

